

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平5-301893

(43)公開日 平成5年(1993)11月16日

(51)Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 0 7 K 13/00		8619-4H		
C 1 2 N 1/21		7236-4B		
5/10				
		8931-4B	C 1 2 N 15/ 00	A
		7236-4B	5/ 00	B

審査請求 未請求 請求項の数11(全 36 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願平4-3399	(71)出願人	000002934 武田薬品工業株式会社 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号
(22)出願日	平成4年(1992)1月10日	(72)発明者	成尾 憲一 兵庫県三田市南が丘1丁目1番2号
(31)優先権主張番号	特願平3-20860	(72)発明者	瀬古 智佐子 大阪府高槻市塚原1丁目7番9-306号
(32)優先日	平3(1991)2月14日	(72)発明者	黒川 勉 兵庫県川西市水明台1丁目1番地の50
(33)優先権主張国	日本(JP)	(72)発明者	近藤 達也 東京都文京区本駒込5丁目4番6-1201号
(31)優先権主張番号	特願平3-224454	(74)代理人	弁理士 大多和 明敏 (外1名)
(32)優先日	平3(1991)9月4日		
(33)優先権主張国	日本(JP)		

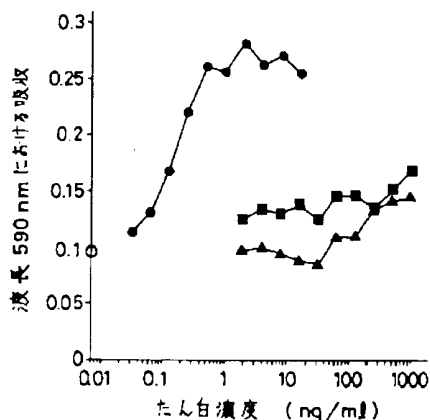
(54)【発明の名称】 グリア活性化因子およびその製造法

(57)【要約】

【目的】 グリア細胞に特異的に増殖促進および栄養活性作用を有する新規な因子を見出すと共に、このものを効率よく製造する方法を提供する。

【構成】 ヒト由来グリオーマ細胞株を培養した細胞培養上清から、ラット脳細胞からのグリア細胞増殖活性を指標としてグリア活性化成長因子を単離、精製し、それをコードするcDNAの塩基配列、それから推定されるアミノ酸配列を解明すると共に、遺伝子工学的にGAFを発現した。

【効果】 本発明で得られたグリア活性化因子は新規な蛋白質で、グリア細胞、線維芽細胞に対し増殖活性を有し、脳疾患改善薬等の医薬として用いることが期待できる。



- ▲ : rhGAF 添加群
- : rhGAF およびヘパリン(20μg/ml) 添加群
- : bFGF 添加群
- : 無添加群

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 グリオーマ細胞培養液より得られ、かつグリオーマ細胞増殖促進活性を有する蛋白質であるグリア活性化因子。

【請求項2】 グリオーマ細胞がヒトグリオーマ細胞である請求項1記載のグリア活性化因子

【請求項3】 アミノ酸配列：

Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp

で示されるポリペプチドを含むグリア活性化因子または該因子作用を有するそのムネン。

【請求項4】 アミノ酸配列：

(Met)n-XI-Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp -X2

〔ただしnは0または1を、X1はAla Pro Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly Pro Ala Val Thr Asp またはその断片

を、X2はLys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser またはその断片を、それぞれ示す〕で示されるポリペプチドからなる請求項3記載のグリア活性化因子

【請求項5】 アミノ酸配列：

(Met)n-X3 Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly  
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

〔ただしnは0または1を、X3はAla Pro もしくは Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu Leu またはその断片を、それぞれ示す〕で示されるポリペプチドからなる請求項3記載のグリア活

性化因子。

【請求項6】 グリア活性化因子をコードするポリヌクレオチドを含有するDNA。

【請求項7】 ポリヌクレオチドが塩基配列：

TTG GATCATTTAA AGGGGATTCT  
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCATT CTGGAATTTA TCAGTATAGC

AGTGGGCTG GTCAGCATTC GAGGCGTGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA  
GCGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTGAGAG AACAGTTCGA  
AGAAAACCTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTAATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG  
ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAACGGCA  
CCAGAAATTC ACACATTTT FACCTAGACC AGTGACCCC GAC

で示されるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドである請求項6記載のDNA 【請求項8】 ポリヌクレオチドが塩基配列：

Y1-TTG GATCAATTAA AGGGGATTC  
CAGGCGGAGG CAGCTATCT GCAGGACTGG ATTCACTTAA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCAIT CTGGAATTTA TCAGTATAGC  
AGTGGGCTG GTCAGCATTC GAGGCGTGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA  
GCGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTGAGAG AACAGTTCGA  
AGAAAACCTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTAATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG  
ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAACGGCA  
CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGACCCC GAC

【ただし、Y1は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTTT CGG  
TGTGCAG GATGCGGTAC CGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCCGTG  
G ACAGCCCGGT TTGTGTAAGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA AGCA  
GGGGGG CTCCCAAGGG GACCCGAGT CAGGAC またはその断片を、Y2はAAAGTAC CTGAACCTGTA TAAGGATATT CTAAGCCAAA

GT またはその断片を、それぞれ示す）ないしその5'末端に開始コードATGを含有する塩基配列で示されるポリヌクレオチドである請求項6記載のDNA。

【請求項9】 ポリヌクレオチドが塩基配列：

Y3-AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA  
AGCAGGGGGG CTCCCAAGGG GACCCGAGT CACGACTTG GATCAATTAA AGGGGATTC  
CAGGCGGAGG CAGCTATCT GCAGGACTGG ATTCACTTAA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCAIT CTGGAATTTA TCAGTATAGC  
AGTGGGCTG GTCAGCATTC GAGGCGTGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA  
GCGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTGAGAG AACAGTTCGA  
AGAAAACCTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTAATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG  
ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAACGGCA  
CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGACCCC GACAAAGTAC CTGAACCTGTA  
TAAGGATATT CTAAGCCAAA GT

【ただし、Y3は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTTT CGG  
TGTGCAG GATGCGGTAC CGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCCGTG  
G ACAGCCCGGT TTGTGTAAGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA AGCA  
GGGGGG CTCCCAAGGG GACCCGAGT CAGGAC またはその断片を示す）ないしその5'末端に開始コードATGを含有する塩基配列で示されるポリヌクレオチドである請求項6記載のDNA。

【請求項10】 請求項6記載のDNAを含有するベクターで形質転換された形質転換体

【請求項11】 請求項10記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にグリア活性化因子を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする該因子の製造法

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はグリア細胞培養液より得られ、グリア細胞、線維芽細胞等に対して増殖促進作用を示す、新規なポリヌクレオチドであるグリア活性化因子、該因子をコードするDNA、および該因子製造のための組換えDNAに関する。

【0002】

【従来の技術】 細胞成長因子は、多種のものが発見、研究され、活用されてきている（細胞成長因子 part II、

日本組織培養学会編、1987、朝倉書店）。たとえば、上皮細胞成長因子（EGF, Epidermal Growth Factor）、血小板由来成長因子（PDGF, Platelet-Derived Growth Factor）や酸性あるいは塩基性線維芽細胞増殖因子（aFGFもしくはbFGF, acidic or basic Fibroblast Growth Factor）などである。これらは、いずれも線維芽細胞株の増殖促進を指標として単離されてきたものであり、その作用スペクトラムは広いが、特異性に乏しい。近年、機能分化した細胞に特異的に作用する増殖因子を探す努力が試みられつつあり、セラチノサイト成長因子（KGF, Keratinocyte Growth Factor）、肝実質細胞成長因子（HGF, Hepatocyte Growth Factor）等が単離され、その特異的な作用スペクトラムから疾患への適用が期待されている。脳神経細胞は、生後すぐに増殖を止め、以後、その数を減じて行く。近年、老年での脳疾患、特に痴呆症が問題となってきた。これは、原因不明、あるいは損傷等による脳神経細胞の死滅によることが判ってきた。このような脳神経細胞の死滅を防ぎ止めるためには、これらの細胞を賦活化することが必要である。グリア細胞は脳内で神経細胞

のまわりをとり囲んでおり、脳神経細胞の生存を支持している。グリア細胞が放出しているであろう神経栄養因子の探索は、きわめて広く行われてきたが、まだ決定的な因子は見出されていない。グリア細胞は、その形態、および働きから、I型アストロサイト、II型アストロサイト、マクログリア細胞等に分類されている。これらのグリア細胞を賦活化することは、それ自身では分裂増殖することのない脳神経細胞を賦活、維持することとなり、脳疾患改善に重要な方策となってきた。このため、脳神経細胞のみならず、グリア細胞に作用する増殖因子に渴望されてきた。

#### 【0003】

【発明が解決しようとする課題】前記のように、グリア細胞に作用する増殖因子は、脳神経細胞の賦活化を目ざして、探索されており、PDGF、FGF等が、グリア細胞に対しても増殖促進作用を示すことが知られている。しかし、これらの因子は、他の細胞種に対する増殖促進作用も強く、思うようには医薬品として使用され得てはいない。グリア細胞に、より特異的に作用している因子を探し、これを医薬品として活用することは脳疾患の改善の方策として期待されていたが、現在まで、このような因子は得られていない。

#### 【0004】

【課題を解決するための手段】一般的に、多くの細胞は自分自身の増殖を促す増殖促進因子を産生していることが知られるようになってきた。そこで本発明者らは、グリア細胞が産生する、グリア細胞に対する増殖促進因子について探索した。この結果、グリア細胞が該因子を産生していることを見出したが、ヒト・グリア細胞をヒトから採取することはできず、また、一般にそのままで維

持、培養できる細胞はない。そこで、グリア細胞としての形質を残しているグリオーマ細胞株を用いて検討を重ね、この因子（グリア活性化因子、GliaActivating Factor、以下GAFと略称することがある。）を単離、精製した。

【0005】一方、ヒトグリオーマ細胞より得られたGAFは極めて微量であり、医薬品として、あるいは研究材料として使用するため充分な量を得るには、大量のグリア細胞を培養するための時間と労力が必要とされる。そこで本発明者等は、さらにGAFをより簡便に得るために、GAFをコードするリヌクレオチドを同定し、該リヌクレオチドを用いて近年発展してきた組換えDNA技術を応用することにより、この問題を解決することも考えた。すなわち、本発明者らは、GAFのN末端側アミノ酸配列を解析し、この配列を基にオリゴヌクレオチドマーカーを合成した。ヒトグリオーマ細胞NM-C-11、あるいはヒト包皮由来初代培養細胞のmRNAより作製したcDNAライブラリーについて上記マーカーを用いて検索し、ヒトGAF cDNAをクローニングした。さらに、該cDNAを含む組換えDNAを構築し、該DNAで形質転換された形質転換体を培養すると、ヒトGAFが生産されることを見出した。本発明者らは、これらの知見に基づき、さらに研究した結果、本発明を完成した。

【0006】本発明は（1）グリオーマ細胞培養液より得られ、かつグリア細胞増殖促進活性を有する蛋白質であるグリア活性化因子、（2）グリオーマ細胞がヒトグリオーマ細胞である上記（1）記載のグリア活性化因子、

#### （3）アミノ酸配列：

Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp

で示されるポリペプチドを含むグリア活性化因子または 該因子作用を有するそのムテイン、

#### （4）アミノ酸配列：

(Met)-N-Ile-Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg

Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp -X2

〔ただしnは0または1を、M は Ala Pro Leu Gly Glu  
Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro P  
he Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val  
Leu Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly G  
ly Leu Pro Arg Gly Pro Ala Val Thr Asp またはその

断片を、X2 は Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile  
Leu Ser Gln Ser またはその断片を、それぞれ示す〕で  
示されるポリペプチドからなる上記(3)記載のグリア  
活性化因子、

(5) アミノ酸配列:

(Met)n X3 Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly  
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

〔ただしnは0または1を、X3 は Ala Pro または Le  
u Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala V  
al Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser

Pro Val Leu Leu またはその断片をそれぞれ示す〕で  
示されるポリペプチドからなる上記(3)記載のグリア  
活性化因子、

(6) アミノ酸配列:

X1' X2' Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly  
Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser

〔ただし、X1' はMet または Met Ala Pro を、X2' は  
Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala  
Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Se  
r Pro Val Leu Leu またはその断片をそれぞれ示す〕で

示されるポリペプチドからなる上記(5)記載のグリア  
活性化因子、(7)グリア活性化因子をコードするポリ  
ヌクレオチドを含有するDNA、

(8) ポリヌクレオチドが塩基配列:

TTG GATCATTTAA AGGGGATTCT  
CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTTGGCATI CTGGAATTTA TCAGTATAGC  
AGTGGGCCCTG GTCAGCATTC GAGCGGTGGA CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA  
GGGGGAGCTG TATGGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTGAGAG AACAGTTCGA  
AGAAAACCTGG TATAATACGT ACICGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG  
ATACATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA  
CCGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GAC

で示されるポリヌクレオチドを含有するポリヌクレオチドである上記(7)記載のDNA、

(9) ポリヌクレオチドが塩基配列:

Y1-ITG GATCATTTAA AGG-GATTCT  
 CAGCGGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCAIT CTGGAATTTA TCAGTAIAGC  
 AGTGGGCTTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA  
 GGGGGAGCTG TATCGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA  
 AGAAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGCGG  
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACCGCA  
 CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCC CAC

【ただし、Y1は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTT CGG  
 TGTGCAG GATGCGGTAC CGTITGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCCGTG  
 G ACAGCCCGGT TTTGTIAAGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA AGCA  
 GGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGAGT CACCGAC またはその断

片を、Y2はAAAAGTAC CTGAACTGTA TAAGGATATT CTAAGCCAAA  
 GT またはその断片を、それぞれ示す】ないしその5'  
 末端に開始コドンATG を含有する塩基配列で示されるポ  
 リヌクレオチドである上記(7)記載のDNA、

(10) ポリヌクレオチドの塩基配列:

Y3-AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA  
 ACCAGGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGAGT CACGGACTTG GATCATTTAA AGCGGATTTCT  
 CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCAIT CTGGAATTTA TCAGTAIAGC  
 AGTGGGCTTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA  
 GGGGGAGCTG TATCGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA  
 AGAAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGCGG  
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACCGCA  
 CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCC CACAAAGTAC CTGAACGTGA  
 TAAGGATATT CTAAGCCAAA GT

【ただし、Y3は GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTT CGG  
 TGTGCAG GATGCGGTAC CGTITGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCCGTG  
 G ACAGCCCGGT TTTGTIA またはその断片を示す】ないし

その5'末端に開始コドンATG を含有する塩基配列で示  
 されるポリヌクレオチドである上記(7)記載のDNA、

(11) ポリヌクレオチドの塩基配列:

Y'-AGT GACCACCTGG GTCAGTCCGA  
 ACCAGGGGGG CTCCCCAGGG GACCCGAGT CACGGACTTG GATCATTTAA AGCGGATTTCT  
 CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACTTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC  
 TATCCAGGGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGCAIT CTGGAATTTA TCAGTAIAGC  
 AGTGGGCTTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA  
 GGGGGAGCTG TATCGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA  
 AGAAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGCGG  
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACCGCA  
 CCAGAAATTC ACACATTTT TACCTAGACC AGTGGACCC CACAAAGTAC CTGAACGTGA  
 TAAGGATATT CTAAGCCAAA

【ただし、Y'は AT GCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATTT  
 CGGTGTCAG GATGCGGTACCGTTTGGGAA TGTGCCCGTG TTGCCG  
 GTGG ACAGCCCGGT TTTGTIA またはその断片を示す】で  
 示されるポリヌクレオチドである上記(10)記載のDNA、(12)上記(7)記載のDNAを含有するベク  
 ターで形質転換された形質転換体、(13)上記(1  
 2)記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中にグリ  
 ア活性化因子を生成蓄積せしめ、これを採取することを  
 特徴とする該因子の製造法に関するものである。

【0007】本発明のGAFは第一にヒト由来グリマ  
 マ細胞株または上記(6)の形質転換体を培養して得ら  
 れた培養液上清からグリマ細胞増殖活性を指標として単  
 離された蛋白質からなり、かつグリマ細胞、線維芽細胞

に増殖促進活性を有するグリマ活性化因子を要旨とす  
 る。更に本発明のGAFは、次の特徴を有する:

(a) ヘパリン親和性を有する(ヘパリンセファロース  
 カラムより0.4~0.9M食塩濃度で溶出され  
 る)。

(b) 分子量: SDSホリアクリルアミドゲル電気泳動  
 法で測定して、25000、29000、30000の  
 三種の分子種がある。

(c) 活性の安定性: 100℃、5分の熱処理で活性を  
 失い、またpH2、30分処理で部分的に活性を失う。

(d) 抗原性: 血小板由来成長因子(PDGF)、酸性  
 線維芽細胞増殖因子(aFGF)、塩基性線維芽細胞増  
 殖因子(bFGF)との間に免疫学的交差性を示した

い。

(e) 生物活性 グリア細胞、線維芽細胞、ラット副腎髄質褐色細胞腫由来PC-12細胞、に対して増殖促進活性を有す。

本発明のGAFは、分子量25000、29000、30000の三種の分子種があり、それぞれ分子種が一つの蛋白質であり、いずれも同等の生物活性を有していることが認められる。

【0008】本発明において、さらに以下由来のグリア細胞株または上記(6)の肝臓転換体を培養し、その培養上清よりGAF活性化因子を採取し、それを精製することを特徴とするGAFの製造法が提供される。本発明によるGAFを得るための該因子を含む細胞培養上清は、グリア細胞、例えばヒトグリア細胞NMG-1G1の培養により得られる。グリア細胞の培養には静置培養、ローラボール培養、セカンドパストラーあるいは懸濁培養等のいかなる方法も用いられ得るが、好ましくはローラボール培養が用いられる。培地としては動物細胞用の培地、例えば、MEM培地、「サイエンス(Science)」, 122, 501(1952)」、DMEM培地(「サイコロジ(Virology)」, 8, 396(1959)」、RPMI 1640培地[「ジャーナル・オブ・ザ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(Journal of the American Medical Association)」, 199, 519(1967)」、199培地[「プロシデイング・オブ・ザ・ソサエティ・フォー・バイオロジカル・メディスン(Proceeding of the Society for the Biological Medicine)」, 73, 1(1950)」などが挙げられ、好ましくは、DMEM培地が用いられる。培養にはこれにさらに約10～20%の胎児牛血清を添加しても良い。pHは約6～8であるのが好ましい。培養温度は30～40℃、好ましくは37℃で約24～100時間行い、必要に応じて培地交換を行う。

【0009】上記培養液よりGAF蛋白を分離精製するには、自体公知の分離精製法を適切に組み合わせて行うことが出来る。これらの公知の分離、精製法としては、塩析や溶媒沈殿法などの溶解度を利用する方法、透析法、限外ろ過法、ゲルろ過法、およびSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法などの主として分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動法などの荷電の差を利用する方法、アフィニティ・クロマトグラフィーなどの特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィーなどの疎水性の差を利用する方法などが挙げられる。さらに具体的に、上記培養液を遠心分離して夾雑沈殿物を除いた後、ヘパリンセファローゼクロマトグラフィーに付し、GAF蛋白を吸着、溶出することにより、効率よく該蛋白の濃縮、精製を行うことが出来る。

【0010】セファクルS-200等を担体としたゲルろ過もGAF蛋白の精製に有効である。例えば、ヘパリンセファローゼカラムで濃縮されたGAF蛋白を含む

溶出液を、さらに限外ろ過法などを用いて濃縮してセファクルS-200カラムを用いるクロマトグラフィーに付し、中性付近の緩衝液で溶出する。CMセルローゼ等の酸性樹脂のカラムクロマトグラフィーも有効である。たとえば、弱酸性緩衝液で平衡化したカラムを用いて、同じ緩衝液で透析した試料をクロマトグラフィーに付し、NaClなどの塩の直線濃度勾配溶出を行うことができる。また、ヘパリンセファローゼを担体としたアフィニティ・クロマトグラフィーは極めて有効である。例えば、中性付近のトリス塩酸あるいはトリスリン酸などの緩衝液で平衡化したヘパリンセファローゼカラムを用いて、GAF蛋白を含む溶液をクロマトグラフィーに付し、十分洗った後、NaClなどの塩の直線濃度勾配溶出を行うことによりGAF蛋白を精製することができる。特に高速液体クロマトグラフィー用に関連されたヘパリンカラム(例えばShodex AFpak HR-894、昭和電気製など)は有効であり、前記ヘパリンセファローゼと同様に利用することが出来る。逆相高速液体クロマトグラフィーは、多くの蛋白の精製に威力を発揮しており、GAF蛋白もこの担体を用いて精製することができる。例えば試料を0.1%トリフルオロ酢酸を含む溶液としてカラムにかけ、0.1%トリフルオロ酢酸に添加したアセトニトリルの濃度勾配によって溶出を行うことができる。上記の操作を適宜、組み合わせることによりGAF蛋白を均一な標品として回収することができる。また、精製過程、あるいは保存過程での微量のチータージェントの共存は、標品の担体、あるいは容器への非特異的吸着を防ぐのに好適である。チータージェントとしてはCHAPS(3-[(3-(Cholamidopropyl)dimethylammonio)-1-propanesulfonate)、NP-40、Iriton X100などが挙げられるが、特にCHAPSが好ましい。

【0011】培養上清中および精製過程でのGAF蛋白の活性は、例えばラット胎児(19日令)脳より分離採取した初代培養グリア細胞、あるいは公知のBALB/c 3T3細胞に対する<sup>3</sup>H-チミジン取り込みを指標とした増殖促進効果などにより測定することができる。得られた精製標品は透析、凍結乾燥を行い、乾燥粉末とすることもできる。さらに血清アルブミンなどを添加して保存することも好適である。得られた精製標品を用いて、GAF蛋白の糖鎖構造を調べることもできる。この目的のためにはレクチンを用いたブローチンゲ糖鎖分解酵素などが使用され得る。得られた精製標品は、そのままN末端側アミノ酸配列を調べることもできる。また、蛋白分解酵素、たとえば、トリプシン、ジギルエン、カバチノーゼ、V8プロテアーゼ等で分解処理したのち、生じたペプチド断片を逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて分離し、それぞれについて、アミノ酸配列を調べる事が出来る。アミノ酸配列の決定には自動アミノ酸配列分析計(例えばモデル470A、アプライド

ハイブリヂェムズ、米国)が特に有効に使用される。

【0012】得られたアミノ酸配列をもとに、対応する塩基の塩基配列を求め、サリゴマクレナチドを合成してGAT蛋白をコードしているcDNAのクローニングに用いることが出来る。

【0013】cDNAを得られれば、このcDNAを微生物、例えば大腸菌、枯草菌、酵母などにて発現させて、GAT蛋白をより容易に得ることが出来る。また、発現宿主としては動物培養細胞も用いられ、糖鎖構造が必要な場合には、きわめて好適な宿主として用いられることとなる。この様に遺伝子工学的手法を用いることにより、より容易にGAT蛋白の大量生産への道を開くことが出来る。この様な遺伝子工学的手法によりGATを得る場合、発現宿主の相違または突然変異等によるアミノ酸の欠損、置換等によりここに示すアミノ酸配列が異なることがあるが、このような蛋白であっても、GAT因子作用を有するものであれば、本発明のGATに含まれる。また、動物細胞の培養上清から精製されたGATは、N末端側アミノ酸配列が欠失した分子種の存在し、それらが同比活性を有していたことからみれば、GATのアミノ酸配列の一部を欠失させる、あるいは他方配列を付加する、さらにはアミノ酸配列の一部を置換しても同等の活性を保持させることは可能である。遺伝子工学的手法を用いて、このような変異GAT蛋白をつくり、酵素に対する安定性を高めること等も可能である。

【0014】本発明のヒトグリア活性化因子(1)のリボリボチドをコードする塩基配列を有するDNAを含有する発現ベクターは、例えば(イ)ヒトグリア活性化因子(1)を培養上清より単離精製し、N末端側アミノ酸配列を分析する、(ロ)得られたアミノ酸配列を基に、それをコードするサリゴマクレナチドブローチを合成する、(ハ)ヒトグリア活性化因子をコードするRNAを細胞より抽出し、(ニ)該mRNAから単鎖の相補DNA(cDNA)を、或いて二重鎖DNAを合成し、(ホ)該相補DNAをファージまたはプラスミドに組み込み、(ヘ)得られた組み換えファージまたはプラスミドで宿主を形質転換し、(ト)得られた形質転換体を培養後、形質転換体から適当な方法、例えばDNAブローチを用いたハイブリダイゼーション法により目的とするDNAを含有するファージあるいはプラスミドを単離し、(チ)その組み換えDNAから目的とするクローン化DNAを切り出し、(リ)該クローン化DNAまたはその一部を発現ベクター中のプロモーターの下流に連結する、ことにより製造することが出来る。

【0015】ヒトGATをコードするmRNAは、種々のグリア活性化因子産生細胞、例えばヒトグリア細胞、あるいはヒト線維芽細胞などから得る事が出来る。該ヒトグリア細胞としてはNMC-G1、またヒト線維芽細胞としてはWI-38(ATCC番号CCL-

75)などが挙げられる。上記細胞NMC-G1は平成2年10月31日から財団法人発酵研究所(IEO)に受託番号IEO-50281として、また平成3年2月21日から通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所(FRI)に受託番号FERM-BP-3294としてそれぞれ寄託されており、またWI-38はJ・アム・カン・タイプ・カルチャー・コレクション(The American Type Culture Collection)発行のカタログ・オブ・セル・ラインズ・アンド・ハイブリドマーズ 第5版(Catalogue of Cell Lines & Hybridomas, 5th edition), 1985に掲載されている。

【0016】GAT産生細胞からRNAを調製する方法としては、ウエルシュチンシアナール法(J・エム・チングウィン(J.M. Chingwin)ら、バイオケミストリー(Biochemistry), 18, 529(1979))などが挙げられる。このようにして得られたmRNAを母型とし、逆転写酵素を用いて、例えば岡田(Okayama)らの方法(モレキュラー・ト・セル・バイオロジー(Molecular and Cellular Biology) 2, 161(1982)および同誌 3, 280(1983))に従いcDNAを合成し、得られたcDNAをプラスミドに組み込む。cDNAを組み込むプラスミドとしては、たとえば大腸菌由来のpBR322(シーン(gene), 2, 95(1977)), pBR325(シーン, 1, 121(1978)), pUC12(シーン, 19, 259(1982)), pUC13(シーン, 19, 259(1982)), pUC118, pUC119、枯草菌由来のpUB110【バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochemical and Biophysical Research Communication), 112, 678(1983)】などが挙げられるが、その他のものであっても、宿主内で複製増殖されるものであれば、いずれも用いることが出来る。

【0017】プラスミドに組み込む方法としては、たとえば、マニアチス(J. Maniatis)ら、モレキュラー・クローニング(Molecular Cloning) コーラド・スプリング・ハーバード・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory), 第29頁(1982)に記載の方法などが挙げられる。またファージベクターにcDNAを組み込む方法としては、たとえばヒューン(Hyunh, T.V.)らの方法(ダイー・エヌ・エー・クローニング・テクニック(DNA Cloning, A Practical Approach) 1, 49(1983))などが挙げられる。上記cDNAを組み込まれたプラスミドの例としては、ヒト正常2倍体細胞mRNAより合成したcDNAをベクター、たとえばpCDベクター(Okayama)ら、モレキュラー・セル・バイオロジー(Molecular Cell Biology), 3, 280(1983)参照)を宿主(たとえば、大腸菌x1776)に組み込んで作成してもよい。

【0018】このようにして得られたプラスミドは、適当な宿主たとえばエシェリキア(Escherichia) 属菌、バチルス(Bacillus) 属菌などに導入する。上記エシェリキア属菌の例としては、エシェリキア・コリ(Escheri-



chia coli) K12 DH1 (プロシーディング・オブ・サ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 60, 160 (1968) 1, M103 (ヌクレイック・アシッド・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309 (1981) 1, J.A.221 (プロシーディング・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Molecular Biology), 1, 120, 517 (1978) 1, H.B.191 (プロシーディング・オブ・モレキュラー・バイオロジー, 41, 459 (1969) 1, C.600 (1) (エタケイ・ウツ (Ectocetes), 39, 440 (1951) 1) などを挙げられる。上記バチルス属菌としては、たとえばバチルス・サチリス (Bacillus subtilis) M1114 (シー・シー・シー, 24, 255 (1983), 207-211) (プロシーディング・オブ・モレキュラー・バイオロジー (Journal of Biochemistry), 95, 87 (1984) 1) などを挙げられる。

【0019】バラスミドで宿主を形質転換する方法としては、たとえばカークマン・マニティス (T. Maniatis) から、モレキュラー・クローニング (Molecular Cloning, コーリス・スクリプス・パブリッシャー・ラバートリー (Cold Spring Harbor Laboratory), 第2版 (1982) に記載のカルシウムクロライド法あるいはカルシウムクロライドとポリメチルメタクリレート法などが挙げられる。このようにして得られた形質転換体中からGAFのアミノ酸配列を基に合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして、自他公知の方法、たとえばコロニー・ハイブリダイゼーション法 (シー・シー・シー, 10, 63 (1980) 1) およびDNA塩基配列決定法 (プロシーディング・オブ・サ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.) 74, 560 (1977), ヌクレイック・アシッド・リサーチ, (Nucleic Acids Research), 9, 309 (1981) 1) を用い求めるクローンを選出する。このようにして、クローン化されたGAFをコードする塩基配列を含有するDNAを有するベクターを保持する微生物が得られる。

【0020】上記クローン化されたGAFをコードするcDNAを有するバラスミドは目的によりそのまま、または所望により制限酵素で消化して使用することが出来る。クローン化されたcDNAから発現させない領域を切り出し、発現に適したビークル (ベクター) 中のプロモーターの下流に連結して発現型ベクターを得ることができる。ベクターとしては、上記の大腸菌由来のバラスミド (例、pBR322, pBR325, pUC12, pUC13), 枯草菌由来バラスミド (例、pUB110, pTTP5, pC19.4), 酵母由来バラスミド

(例、pSH19, pSH15), あるいはエプタールなどのバクテリオファージおよびレトロウイルス、ワクシニアウイルスなどを動物ウイルスなどが挙げられる。

【0021】該cDNAはその5'末端に翻訳開始コードを有してATGを有し、また3'末端には翻訳終止コードを有してTAA, TGAまたはTAGを有して、いてもよい。これらの翻訳開始コードと翻訳終止コードは、適当な合成DNAアダプターを用いて付加することでも

きる。さらに該DNAを発現させるにはその上流にプロモーターを接合する。本発明で用いられるプロモーターとしては、遺伝子の発現に用いる宿主に対応して適切なプロモーターであればいかなるものでもよい。形質転換する際の宿主がエシェリキア属菌である場合は、T7プロモーター、trpプロモーター、lacプロモーター、trcプロモーター、SP16プロモーター、lppプロモーターなどが、宿主がバチルス属菌である場合は、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、penPプロモーターなど、宿主が酵母である場合は、PHO5プロモーター、PGKプロモーター、GAPプロモーター、ADHプロモーターなどが好ましい。とりわけ宿主がエシェリキア属菌でプロモーターがT7プロモーターまたはlppプロモーターであることが好ましい。宿主が動物細胞である場合には、SV40由来のプロモーター、レトロウイルスのプロモーターなどが挙げられ、とりわけSV40由来のプロモーターが好ましい。

【0022】このようにして構築されたGAFをコードするcDNAを含有するベクターを用いて、形質転換体を製造する。宿主としては、たとえばエシェリキア属菌、バチルス属菌、酵母、動物細胞などが挙げられる。上記エシェリキア属菌、バチルス属菌の具体例としては、前記したものと同様のものが挙げられる。上記酵母としては、たとえばサッカロマイセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae) AH22R<sup>+</sup>, NA87-11A, DKD-5Dなどが挙げられる。動物細胞としては、たとえばサル細胞COS-7, Vero, チャイニーズハムスター細胞CHO, マウスL細胞, ヒトFL細胞などが挙げられる。

【0023】上記エシェリキア属菌を形質転換するには、たとえばプロシーディング・オブ・サ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 69, 2110 (1972) やシー・シー・シー, 17, 107 (1982) などに記載の方法に従って行なわれる。バチルス属菌を形質転換するには、たとえばモレキュラー・アンド・ジェネラル・ジェネティクス (Molecular & General Genetics), 168, 111 (1979) などに記載の方法に従って行なわれる。酵母を形質転換するには、たとえばプロシーディング・オブ・サ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス (Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.), 75, 1929 (1978) に記載の方法に従って行なわれる。動物細胞を形質転換するには、たとえばウイルス学 (Virology) 52, 456 (1973) に記載の方法に従って行なわれる。

【0024】このようにして、GAFをコードするcDNAを含有する発現ベクターで形質転換された形質転換体を得られる。その一例としては、たとえば後述の実施例5で得られた *Escherichia coli* DH1-1 (pGAF1) が挙げられ、該微生物は、平成3年8月28日に財団法人発酵研究所 (IFO) に受託番号IFO

15217として寄託されており、また通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所（FRI）に平成3年9月2日付の受託番号FERM-BP-3547としてそれぞれ寄託されている。また実施例8で用いたEscherichia coli MV294(DL3) plusS, pEIGASは、平成3年12月3日に財団法人発酵研究所（FEO）に受託番号FEO-1524Sとして寄託されており、また通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所（FRI）に平成3年12月24日付の受託番号FERM-BP-3689としてそれぞれ寄託されている。

【00025】前記においては、フコシア属菌、フコシア属菌である形質転換体を培養する際、培養に使用される培地としては液体培地が適当であり、その中には該形質転換体の生存に必要な炭素源、窒素源、無機物その他が含有せしめられる。炭素源としては、たとえばグルコース、アキツトリブ、可溶性糖類、オリ糖など、窒素源としては、たとえばアンモニウム塩和、硝酸塩和、コリンスレーブ・メカール、ペプチド、カゼイン、肉エキス、大豆粉、小麦胚芽抽出液などの無機または有機物質、無機物としてはたとえば塩化カルシウム、リン酸（水素ナトリウム、塩化マグネシウムなどが含まれる。また、酵母、ビタミン類、生長促進因子などを添加してもよい。培地のpHは5〜8が望ましい。フコシア属菌を培養する際の培地としては、例えばグルコース、カゼイン酸を含むM9培地（ミラー(Miller)、リヤード・サザ・エクスベリス） $\beta$ -イン・モレキュラー・ジエクスプレックス(Journal of Experiments in Molecular Genetics), 431-433, Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1972) が好ましい。ここに必要によりフコモーターを効率よく働かせしめるために、たとえば $\beta$ -イントリアル・アルカリ性酵素のような薬剤を加えることのできる。

【0026】宿主がエントロピー系属の場合、培養は通常約15～43℃で約3～2時間行い、必要により、通気や攪拌を加えることもできる。宿主がバクテリウス属の場合、培養は通常約30～40℃で約6～24時間行ない、必要により通気や攪拌を加えることもできる。宿主が酵母である脂質転換体を培養する際、培地としては、たとえばバークホルダー(Burkholder)最小培地(Best, K. L. 他、「プロシーディング・オブ・ザ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス(Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 77, 4505(1980)」)が与えられる。培地のpHは約5～8に調整するのが好ましい。培養は通常約20℃～35℃で約24～72時間行い、必要に応じて通気や攪拌を加える。宿主が動物細胞である脂質転換体を培養する際、培地としては、たとえば約5～20%の胎児牛血清を含むMEM培地(サイエンス(Science) 122, 501(1952))、DMEM培地(ウィロロジー(Virology), 8, 396(1959))、RPMI 1640培地(ジャーナル・オブ・アメリカン・メディカル・アソシエーション(The Journal of the American Medical Association) 199, 51

9(1967)], 199 培地: アロシール・グ・ナフ・サ・ソサ  
イエテ・フオー・サ・アロシール・メテ・ス

【0007】上記培養物からGAEを分離精製するには、例えば下記の方法により行うことができる。GAEを培養菌体あるいは細胞から抽出するに際しては、培養後、公知の方法で菌体あるいは細胞を集め、これを殺菌液である、又は塩酸酢酸処理などの蛋白質変性剤を含む液に懸濁し、超音波、ミキサー等を用い、または凍結融解によって菌体あるいは細胞を破壊したため、遠心分離によりGAEを得る方法など公知有用である。

【0028】抽出液よりGAFの精製は通常の精製方法を用いられ得る。例えば硫酸による分画、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ゲル濾過など、いずれを用いてもよい。また精製過程での蛋白分解酵素阻害剤の共存は、分解を受けていない蛋白を得るのに好適である。また精製過程での緩和な表面活性剤の共存は、収量を高めるのに好都合である。例えばCHAPSなどは好ましい。天然型GAFの精製に用いたヘパリンカラムは極めて有効に使用される。これらを組み合わせることにより、均一なGAF蛋白を得ることができ、ここに製造されるGAFはクリア細胞に対する増殖促進活性を有するので、脳の損傷等の治療促進剤として用いることが出来る。また脳神経細胞損傷による疾患、脳浮腫、アルツハイマー病、老人性痴呆、さらには糖尿病性網膜症などの応用もできる。他の細胞への作用に比べて、クリア細胞に対する作用が強いので、クリア細胞を特異的に賦活することが期待できる。また、線粒体細胞に対する増殖促進作用を有することから、大傷、創傷、歯肉組織潰瘍、消化器潰瘍の治療促進剤として用いることができる。また、GAFは巨核芽球に作用して、この細胞を増殖分化させ、血小板増加を促すことが見出された。他の造血系あるいは免疫担当細胞の増殖も促進するものと考えられる。特に脳内では免疫担当細胞としてミクログリアが存在しており、この細胞の賦活にも関与しているものと考えられる。この点からも脳損傷の治療改善に用いることができよう。GAFはヒトさい帯由来血管内皮細胞にはほとんど作用しなかったが、血管平滑筋細胞には増殖促進作用を有している。

【0029】さらに他の増殖因子、aFGF、bFGF、TGFなどと同様に骨形成を促進する作用も期待され、骨折や骨粗鬆症への適用も考えられる。GAD-cDNAはbFGF、TGF- $\alpha$ 、PDGFなどと同様に線維芽細胞を骨質転換することができる。この性質から、GADの上昇が細胞内での転写因子としての悪性化

の一因となっていることも考えられる。従って、脳腫瘍ではGAEの産生の促進されていると考えられるので、GAEおよびその抗体さらにはGAE-cDNAは腫瘍の診断にも有用となる。またグリア細胞の培養研究には、有効な因子として活用され得る。

【0030】本発明のGAEを医薬として用いるには、そのまま粉末として、または他り乳剤学的に許容される担体、賦形剤、希釈剤とともに医薬組成物（例えば、注射剤、錠剤、カプセル剤、散剤、軟膏など）として、温血哺乳動物（例、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、犬、ネコ）に対して経口のまたは経口的に安全に投与することによって、その作用の製剤化にたとえば生理食塩水またはグリセリンやその他の補助薬を含む水溶液を用い、常法に従って与えられる。錠剤、カプセル剤等医薬組成物も常法に従って調製しうる。さらに、医薬組成物としての注射剤、散剤、錠剤、カプセル剤等を製造する際には、無菌条件下で行なう。本発明のGAEを上記の医薬として用いる場合には、たとえば上記した温血動物に、投与ルート、症例などを考慮して、1回約0.5mgないし50 $\mu$ g/kg、1日量約1mgないし100 $\mu$ g/kgの中から適当量を選んで投与される。また、本発明のGAEを細胞培養を促進させるための試薬として用いる場合、培地1リットルあたり約0.01~10 $\mu$ gさらに好ましくは約0.1~10 $\mu$ gとなるように培地に加えることが好ましい。

【0031】本発明明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければL-体を示すものとする。

【0032】DNA：デオキシリボ核酸

cDNA：相補的デオキシリボ核酸

A：アデニン

T：チミン

G：グアニン

C：シトシン

RNA：リボ核酸

mRNA：メッセンジャーリボ核酸

dATP：デオキシアデノシン三リン酸

dTTP：デオキシチミン三リン酸

dGTP：デオキシグアニン三リン酸

dCTP：デオキシシトシン三リン酸

ATP：アデノシン三リン酸

EDTA：エチレンジアミン四酢酸

SDS：ナトリウム硫酸サリウム

GlyまたはG：グリシン

AlaまたはA：アラニン

ValまたはV：バリン

LeuまたはL：ロイシン

IleまたはI：イソロイシン

SerまたはS：セリン

ThrまたはT：スレオニン

CysまたはC：システイン

MetまたはM：メチオニン

GluまたはE：グルタミン酸

AspまたはD：アスパラギン酸

LysまたはK：リジン

ArgまたはR：アルギニン

HisまたはH：ヒスチジン

PheまたはF：フェニルアラニン

TyrまたはY：チロシン

TrpまたはW：トリプトファン

ProまたはP：プロリン

AsnまたはN：アスパラギン

GlnまたはQ：グルタミン

【0033】

【実施例】以下の実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【例1】グリア細胞に対する増殖促進活性の測定

ラット胎児脳より調製したクリア初代培養細胞を非働化したウシ胎児血清を10%含むDMEM培地に3 $\times$ 10<sup>4</sup>個/mlとなるように希薄させた。その細胞を遊液100 $\mu$ lを96穴の平底マイクロプレート（A-Nunc社製、Roskilde、デンマーク）の各ウェルに入れ2~3日間培養後、各ウェルより75 $\mu$ lの培地を廃棄し、各ウェルに血清を含まないDMEM培地175 $\mu$ lを添加した。さらに2~3日間培養した後、各ウェルより20 $\mu$ lの培地を廃棄した。その後非働化したウシ胎児血清を1、2、5%含むDMEM培地で適当に希釈したアストロサイトブルの20 $\mu$ lを各ウェルに添加後、一晚培養した。翌朝、各ウェルに1 $\mu$ lのトリチウムチミン（5Ci/mmol、1mCi/ml、RCC-Amersham）を添加後、さらに5~7時間培養した。培養後、各ウェルの培地を廃棄後、各ウェルに100 $\mu$ lの0.5%トリチンと0.01%EDTAを含むPBSを添加し、数分間室温にて放置した。顕微鏡でクリア細胞が浮遊していることを確認した後、浮遊細胞をタイターテクセルフローマスター（Flow Laboratories社製、Virginia, U.S.A.）を用いてガラスファイバーフィルター（大日本製薬株式会社製）上に集め水で洗浄後、細胞に取り込まれたトリチウムチミンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0034】実施例1

①クリアマ細胞NMC-G1の培養上清の採取  
ヒトグリアマ細胞NMC-G1を、10%ウシ胎児血清を含むDMEM培地中でコーニンググローワーボトルを用い回転させながら37℃で培養した（0、2回に分）。コーニンググローワーボトル表面上にNMC-G1

細胞がコンフルエントの状態になった後、培地を0.5%の胎児血清を含むDMEM培地に変更した。3~4日後に、細胞培養上清を採取し、培地を新しい0.5%の胎児血清を含むDMEM培地に変更した。採取した細胞培養上清を遠心分離(5,000rpm、5分、4℃)、上清を遠心分離(5,000rpm、5分、4℃)し、遠心上清を得、精製抽出を材料とした。

## 【0035】2GAT+精製

に記した方法で得たNMC-G1細胞培養上清1.8リットルに5M NaCl水溶液を1.50容量(3.60mL)、1.0M NaNO<sub>3</sub>を1.1000容量(1.80mL)添加した。これにより調製したNMC-G1細胞培養上清を、60°Cに60分、2M NaClを含む2.0mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で平衡化したペリカセアフローラ(金庫商標)CL6Bカラム(カラム容積は8.0mL, Pharmacia LKB, Biotechnology社製, Uppsala, Sweden)に2.5mMグルコースを用いて通す(流速1.50mL/時間、4°C)。上清を4.50mLの0.2M NaClを含む2.0mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で洗浄した後(流速1.50mL/時間、4°C)、吸着したタンパク質を4.00mLの2M NaClを含む2.0mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で溶出した(6.0mL/時間、8mL/フラクション、4°C)(図1)。溶出した各フラクションについてグリブ細胞に対する増殖促進活性を参考文献に記載の方法で測定し、活性を示した画分(フラクション11からフラクション23)を集めた。

【0036】 7分、72、濃縮

合計32 Lのトリクル培養上清についてステアシルカステアトリンとブドウ糖を添加したアセトキシカルニチンカラムクロマトグラフィー（ステアシルカステアトリン）を行ない活性画分をブールした（1.92 ml）。この画分をDialflow YM-10メンブレン（分離分子量：10,000, Amicon Corp社製, Massachusetts, U. S. A.）で空ろカス圧下約3.5 mlにまで濃縮した（4°C）。

【 〇 〇 三 七 】

ステップ3: ケルろ過カラマツコロイドクレンジー  
ステップ2で濃縮した溶液約3.5mlをセファクリアS-  
200HR (セプト容積は178.7ml、内径5cm、長さ  
91cm、Pharmacia LKB Biotechnology) にのせ、  
0.5M NaClと0.1%CHAPSを含む2.0mM  
トリ塩酸緩衝液で溶出・分離した(8.5ml/時間、1  
0ml/フラクション、4°C) (S2)。各分画について  
クリア細胞に対する増殖促進活性を参考文献1に記載の方  
法で測定し、活性を示した画分(フラクション1.05から  
フラクション1.17)をマージした。さらに5.5リッ  
ド中のNMC-G1培養上清について、ステップ1、  
ステップ2の操作を1回ずつ回に分けて行った。

【0038】 2,4,6-トリクロロベンゾイルニテールカラ

ムクロマトグラフィー

3回のゼラチン過カラムクロマトグラフィーでの活性画分をマニピュレーションした(3.9.0ml)。マニピュレーション溶液に9.9mlの1.0.0%グリセリン、2.6.1mlの1.0%CHAPS水溶液、5.2.2mlの1Mトリス塩酸緩衝液(pH7.6)と1.5.4mlの水を添加した(合計6.5.1ml)。これを用いたため、0.3M NaCl、0.1%CHAPSと1.5%グリセリンを含む2.0mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で平衡化したS-130セファローズ(登録商標)CL-6Bカラム(テスト容積は5.8ml)に通じた(2.5ml/時間、4°C)。カラムを8.0mlの0.3M NaCl、0.1%CHAPSと1.5%グリセリンを含む2.0mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で洗浄した後(2.5ml/時間、4°C)、吸着したタンパク質を0.3M NaClの濃度を直線的に上昇させることにより溶出し、分画した。塩濃度勾配は0.3M NaCl、0.1%CHAPSと1.5%グリセリンを含む2.0mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)5.0mlに、1.2M NaCl、0.1%CHAPSと1.5%グリセリンを含む2.0mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)5.0mlを添加していくことにより作製した(2.5ml/時間、2ml/分ラッシュ、4°C)。(4.3)

【0039】スチレン-5-ノルボルン-アノニエン-高速  
液体クロマトグラフィー

フラスコ4でのグリセリン細胞に対して増殖促進作用を示す活性画分(フラクションNo. 23-30)をブーシした1.6mlに、3.2mlの0.1%CHAPSと1.5%グリセリンを含む2.0mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)を添加した。この4.8mlの溶液のうち4.6mlを、HR-89.4カラム(径8mm・長さ50mm、昭和電工、日本)を装填した高速液体クロマトグラフィー(Varian model 5040 system, Varian Associates社製, California, U. S. A.)にかけた。シリンに吸着したたんぱく質は、NaClの濃度を直線的に上昇させることにより、流速1ml/分に溶出し、分画(1ml/フラクション)した。用いた緩衝液はAが0.2M NaCl、0.1%CHAPSと1.5%グリセリンを含む2.0mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)で、Bが2M NaCl、0.1%CHAPSと1.5%グリセリンを含む2.0mMトリス塩酸緩衝液(pH7.6)である。溶出のプログラムは次に記すとおいて行なった。すなわち0分(100%A)-10分(90%A+10%B)-15分(90%A+10%B)-50分(65%A+35%B)-60分(100%B)-64分(100%B)-65分(100%A)として行なった(表4)。カラム温度は室温であった。

【 ( ) ( ) .4 ( ) 】

フラーゼ6:通相高速液体カラムクロマトグラフィー  
フラーゼ5で得られた活性画分(フラクションNo. 3  
2-38)をブーランドした7mlに、1.75mlの0.5M

リン酸緩衝液 (pH 6.0) を添加した。この 8.75 ml の溶液のうち 8 ml を、Vydac C4 カラム (径 0.46 cm × 長 25 cm, Vydac, California, U. S. A.) を装置した高速液体クロマトグラフノー (Varian model 5040 System) にかけた。吸着したたんぱく質はアセトニトリルの濃度を直線的に上昇させることにより流速 0.8 ml/分 で溶出・分画 (0.8 ml/分画) した。用いた溶媒は A が 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA) + 9.9% 水、B が 0.1% TFA + 9.0% アセトニトリルとした。溶出のプログラムは次に記すとおりで行なった。すなわち 0 分 (100%A) - 15 分 (65%A - 35%B) - 110 分 (50%A - 50%B) - 112 分 (100%B) - 117 分 (100%B) - 120 分 (100%A) として行なった (図 5)。カラム温度は室温であった。分取後、スピードバ

ックコンセンレーター (モデル A290, サーバント社製、米国) でアセトニトリルを除去した後、蒸留水を添加してすべての画分を 0.5 ml の液量に調整した。活性画分 (フラクション 55, 59, 60, 61, 62) を D-メルカプトエタノール存在下 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、銀染色した結果を図 6 に示す。各画分は各々 25 kDa (フラクション 55), 29 kDa (フラクション 59, 60), 30 kDa (フラクション 61, 62) の単一なバンドを与えた。

#### 【0041】⑤ 精製の要約

NMC G1 培養上清 33 リットルを用いての精製の要約を表 1 に記す。

#### 【0042】

#### 【表 1】

サンプル	全たんぱく量 (mg)	全活性 (U)	比活性 (U/μg)	活性回収率 (%)	精製倍数
ヘパリン 2 モル 食塩溶出液	221	$177 \times 10^5$	$8.0 \times 10^2$	100	1
濃縮 (YN-10)	217	$216 \times 10^3$	$1.0 \times 10^3$	122	1.3
セファクリル S-200HR	17.3	$126 \times 10^3$	$7.3 \times 10^3$	71	9.1
ヘパリンカラム (2 回目) 2.12		$60.6 \times 10^3$	$2.9 \times 10^4$	34	38
ヘパリン HPLC	0.453	$34.5 \times 10^3$	$7.6 \times 10^4$	20	95
送相 EPLC 分子量 25,000	0.0003 *	$1.84 \times 10^3$	$6.1 \times 10^6$	1.1	7,600
分子量 29,000	0.0002 *	$1.25 \times 10^3$	$6.3 \times 10^6$	0.7	7,900
分子量 30,000	0.0011 *	$4.85 \times 10^3$	$4.4 \times 10^6$	2.8	5,500

【0043】生物活性の測定は、参考例 1 に記載した方法で行なった。生物活性の単位はトリチウムチミジンの 50% 取り込み値を示すサンプルの希釈率の逆数とした。なお、トリチウムチミジンの 100% 取り込み値は、10% ウシ胎児血清により誘導される値とした。蛋白質量は 280 nm における吸光度 1.0 が 1 mg/ml の蛋白濃度であるとして換算した。\*印の蛋白質量は銀染色による標準蛋白の染色強度を基に決定した。

#### 【0044】

実施例 2 GAF の各種培養細胞に対する作用 (1)

#### (1) グリア細胞に対する増殖促進活性

実施例 1-2 に記載した方法で得られた精製本因子は、グリア細胞に対し増殖促進活性を有している (図 7)。図中横軸は GAF 濃度を示す。なおグリア細胞に対する

増殖促進活性の測定方法については、参考例 1 に記載した方法に従って行なった。精製の最終ステップである逆相高速液体クロマトグラフノーおよびアセトニトリルを除去する操作をした直後の精製標品について、再度グリア細胞に対する増殖促進活性を測定した。その結果を図 8 に示す。図中横軸は GAF 濃度を示す。図 7 と図 8 の結果において、50% トリチウムチミジン取り込み値を与える GAF 濃度に差が生じたりは、以下の理由によると考えられる。すなわち、図 7 は精製後 -80°C で保存後標品を用いた時の結果であり、低蛋白濃度溶液の凍結融解操作により GAF 蛋白が変性失活または容器へ吸着したものと推測される。

#### 【0045】(2) グリア細胞増殖促進活性②

GAF を添加した後のグリア細胞数の変化を調べた。以

下に記載した方法に従って行った。非働化したウシ胎児血清を1.0%含むDMEM培地に $3 \times 10^4$ 個/cm<sup>2</sup>となるように浮遊させ、その500  $\mu$ lを24穴培養プレート(Linco社製、米国)の各ウェルに入れ、3日間培養した。その後各ウェルより440  $\mu$ lの培地を廃棄し、新たに340  $\mu$ lのDMEMを添加した。次に実施例1-2の方法に記載したペルメアブリエーター・カラムクロマトグラフィーで得られたGAF活性画分を、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で50倍に希釈した溶液を50  $\mu$ l、またペルメアブリエーター・カラムクロマトグラフィーで希釈した溶液50  $\mu$ lを添加したウェル、どちらか片方のみを添加したウェル、また対照群として両方を添加しないウェルを作った。全てのウェルは、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で最終容積が500  $\mu$ lとなるようにした後、さらに2日間培養した。培養後、各ウェルを3mlのDMEMで2度洗浄し、0.5mlの0.2%トリプシンと0.01%EDTAを含むPBSを添加し細胞を浮遊させ、各ウェルの細胞数をコールター細胞数計測機(コールター社、ZM型)を用いて算出した。結果を図9に示す。コントロール細胞数はGAFを添加することにより無添加群に比し1.6倍に増加した。しかしペルメアブリエーターを添加したことによる効果はなかった。

【0046】(3) コリア細胞増殖促進活性の経時変化  
GAF・コリア細胞増殖促進活性の経時変化を、以下に記載すること以外は参考例1に記載した方法に従って調べた。すなわち、実施例1-2(4)の方法に記載したペルメアブリエーター・高速液体カラムクロマトグラフィーで得られたGAF活性画分を、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で800倍に希釈したサンプル20  $\mu$ lをウェルに添加後、4、8、13、16、19、22、25、28、31および40時間後には、各ウェルにそれぞれ1  $\mu$ Ciのトリチウムチミンを添加した。3時間後にパーストし、細胞に取り込まれたトリチウムチミンの量を液体シンチレーションカウンターにて測定した。結果を図10に示すが、GAF添加後16から19時間後にトリチウムチミンの取り込みがピークになった。

【0047】(4) 線維芽細胞に対する増殖促進活性  
実施例1-2に記載した方法で得られた精製本因子は、線維芽細胞マウスBALB/3T3 clone A31細胞に対し増殖促進活性を有していた(図11)。図中横軸はGAF濃度を示す。なお線維芽細胞A31に対する増殖促進活性の測定については、以下に記載する方法で行なった。マウスBALB/3T3 clone A31細胞を5%仔牛血清を含むDMEM培地でメンク96穴マイクロタイタープレート(牛込)に1穴あたり $2 \times 10^3$ 個を75  $\mu$ lの培地にて播種して、培養し、翌日、各ウェルより50  $\mu$ lの培地を廃棄し、各ウェルに血清を含まないDMEM培地を175  $\mu$ l添加した。3~4日間

培養したうち各ウェルより20  $\mu$ lの培地を廃棄した。その後、非働化したウシ胎児血清を1.25%含むDMEM培地で適当に希釈したサンプル20  $\mu$ lを各ウェルに添加して晩培養した。翌朝、各ウェルに1  $\mu$ Ciのトリチウムチミン(5Ci/mmol、1mCi/ml RCC、Amersham)を添加後、さらに5~7日間培養した。培養後各ウェルを約1mlのPBSで洗浄し、100  $\mu$ lの5% SDS水溶液を添加し、37℃で一晩放置した。各ウェルの細胞抽出液をチューブに集め、細胞に取り込まれた<sup>3</sup>H-TdR量をシンチレーションカウンターにて測定した。さらに、精製の最終ステップである逆相高速液体カラムクロマトグラフィーおよびアフィニティカラムを用いた前後の精製操作をした前後の精製標品について、5Ci/mmol、1mCi/mlのトリチウムチミン溶液を用いて再度線維芽細胞A31に対する増殖促進活性を測定した。その結果を図12に示す。図中横軸はGAF濃度を示す。図11と図12の結果において、50%トリチウムチミンの取り込み値を与えるGAF濃度で差が生じたのは、以下の理由によると思われる。すなわち、図11は精製後-80℃で保存後の標品を用いた時の結果であり、低蛋白濃度溶液の凍結融解操作によりGAF蛋白が変性失活または容器へ吸着したものと推測される。

【0048】

(5) ヒトさい帯血管内皮細胞に対する作用

実施例1-2に記載した方法で得られた精製本因子は、ヒトさい帯血管内皮細胞に対し増殖促進活性を有していなかった(図13)。図中横軸はGAFまたはbFGFのたん白濃度を示す。なおヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性は以下に記載する方法に従って行なった。本検定に用いられた細胞は、ヒトさい帯より単離された静脈血管内皮細胞(以下HUV E細胞)である。また、細胞増殖度の測定には以下に述べるMTTアッセイ法を用いた。MTTアッセイの手法は多田らの方法(ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッド(J. Immunol. Methods), 93, 157 (1980))に若干の変更を加えた。即ち、細胞維持されているHUV E細胞を0.002% EDTA (ソーテイト社345-01882)を含む0.125%トランスフェレン素溶液(ペルメアブリエーター・カラム社)を用いて単一細胞に解離し、得られた細胞を生胎児血清(ワイタカー・バイオテクノロジ社)を2.5%含む、G412培地(日本製薬398-00515)からなるHUV E細胞培地に懸濁した。この細胞懸濁液に含まれる細胞数をコールター細胞数計測機(コールター社、ZM型)を用いて算出し、3日の培養に供した。 $2 \times 10^3$ 個のHUV E細胞を含む100  $\mu$ lのHUV E細胞懸濁液を、96穴培養皿(マシク社、F96)に加えて、37℃で培養した(日立製酸素・窒素ガス制御培養機CH-16型、CO<sub>2</sub>:5%、O<sub>2</sub>:7%)。培養翌日に、各々のサンプルをHUV E細胞培地に加えた。さらにペルメアブリエーター(カラム社)を終濃度5.0  $\mu$ g/mlないし2.0  $\mu$ g/mlに

なるように添加したものである。各サンプルを加えたのち、さらに培養を3日間行ない、培養皿より培地を除き、 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$  のMTT試薬（バータース社、31101829）を含むHUVF培地を $100 \mu\text{l}$ 加え、 $37^\circ\text{C}$ で4時間保温した。その後、 $1.0\%$  SDS水溶液（和光純薬、9707145）を $100 \mu\text{l}$ 加え、4時間保温を続け、反応終了の後、反応液を含む96穴培養皿を振盪し、反応液が波長 $590 \text{ nm}$ において吸収を、マイクロタイタープレート吸光度測定機（マイクロテック MCC 341）を用いて測定した。

【0049】（6）ラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞に対する作用

実施例1-⑤に記載した方法で得られた精製本因子は、ラット副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞に対して増殖促進活性を有していた（図14）。図中横軸はGAF濃度を示す。なおPC-12に対する増殖促進活性の測定は以上に記載する方法で行なった。GAFを非飽和したフスマ血清を $1\%$ 含むRPMI-1640培地で適量に希釈し、その $50 \mu\text{l}$ を96穴マイクロプレートに入れた。次にPC-12細胞を非飽和したフスマ血清を $1\%$ 含むRPMI-1640培地に $1.0 \times 10^5$ 個 $\cdot \text{ml}^{-1}$ になるように希釈させ、その細胞希釈液 $50 \mu\text{l}$ を96穴の平底マイクロプレート（A. N. Nunc社製、Roskilde、デンマーク）の各ウェルに入れ、さらに2日間培養した。培養後、各ウェルに、 $5 \mu\text{Ci}$ のトリチウムチロシン（ $5 \text{ Ci} \cdot \text{mmol}^{-1}$ ,  $1 \text{ mCi} \cdot \text{ml}^{-1}$  RCCA, Amersham）を添加後、さらに5時間培養した。培養後細胞をTiter tekウェルパーバクターを用いてガラスファイバースプレーター上に集め水で洗浄後、細胞に取り込まれた $^3\text{H}$ -チロシンのカウントを液体シンチレーションカウンターにて測定した。

【0050】（7）活性の安定性

ペーパセファロース（登録商標）CL-6Bカ $2 \text{ M NaCl}$ 溶出画分（実施例1②ステップ1）を、 $100^\circ\text{C}$ で5分熱処理すると活性は完全になくなった。また室温で $\text{pH} 2$ 、30分処理すると部分的に活性を失った（図15）。図中横軸はGAFの希釈倍数を示している。

（8）抗原性：酸性線維芽細胞増殖因子（aFGF）、塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）とクアア活性化因子間の免疫学的交差性

実施例1-⑤に記載の方法により精製した標品について、抗aFGFウサギポリクローナル抗血清と抗bFGFウサギIgGを用いてウエスタンブロッティングを行なった（図16）。図16から判るように本因子はaFGFとbFGFそれぞれとの間に免疫学的交差性を示さなかった。

【0051】実施例3

NMC-G1細胞が産生するGAF蛋白成分の性質

実施例1で得られた $25 \text{ kDa}$  GAF、 $30 \text{ u g}$ 、 $29$

$\text{kDa}$  GAF、 $30 \text{ u g}$ および $30 \text{ kDa}$  GAF、 $60 \text{ u g}$ をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した後、ProBlott（登録商標）（Applied Biosystem社製、カリフォルニア、米国）上に乾式ブロッティング装置（AFT社製、東京）を用いて蛋白をトランスブレイクメンブレンを $2\%$  PVP-360溶液（ $2\%$  ポリビニルピロリドン-360）（シグマ社製、米国）を含む $1\%$  酸緩衝液-食塩（ $8 \text{ g NaCl}$ 、 $0.2 \text{ g KCl}$ 、 $1.15 \text{ g Na}_2\text{HPO}_4$ 、 $0.2 \text{ g KH}_2\text{PO}_4$ を $1 \text{ L}$ の水に溶かし $\text{pH} 7.4$ としたもの）に45分間振とうしつつ浸した後、メンブレンをギザギザ化（ウサハラA（Vector Lab社製、米国）を $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ の濃度で含む $2\%$  PVP-360溶液に移し、1時間振とうした。その後メンブレンをTNT緩衝液（ $0.5 \text{ M NaCl}$ と $0.1\%$  Triton X-100を含む $2.5 \text{ mM}$  トリス塩緩衝液（ $\text{pH} 7.5$ ））で洗浄した（10分間、3回）。さらに、メンブレンをブロッティングに用いるギザギザ化溶液（ベクタスタイン複合物（Standard Vectastain（登録商標）ABCキート、Vector Lab社製）を含むリン酸緩衝液-食塩溶液に45分間振とうしつつ浸した後、TNT緩衝液で洗浄した（10分間、3回）。 $12 \text{ mg}$  4-クロロ-1-ナフトールと $4 \text{ ml}$  スクワールを混せたものに $20 \text{ ml}$  TNT緩衝液（ $0.5 \text{ M NaCl}$ を含む $2.5 \text{ mM}$  トリス塩緩衝液（ $\text{pH} 7.5$ ））と $13.2 \mu\text{l}$  過酸化水素水を混せたものを加え、それにメンブレンを浸し、発色させた。図147にその結果を示す。N-グリコサセを用いる酵素的脱グリコシル化は、Genzyme社（ボストン、米国）のプロトコールに従って実施した。GAFをN-グリコサセ処理した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ゲルを銀染色した結果を図18に示す。 $25 \text{ kDa}$ 、 $29 \text{ kDa}$ および $30 \text{ kDa}$ のGAFは部分的ではあるが、各々その分子量が3から4 kDaだけ減少した。以上、3つの実験より、 $25 \text{ kDa}$ 、 $29 \text{ kDa}$ および $30 \text{ kDa}$  GAFにN-グリコシル型糖鎖が付加していることが確認された。

【0052】実施例4

N末端アミノ酸配列分析

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動（還元条件下）で単一の3種類のGAF（ $25 \text{ kDa}$ 、 $29 \text{ kDa}$ および $30 \text{ kDa}$ ）を、ポリヒモゲンダイブライドタイプIIのメンブレンであるProBlott（登録商標）（Applied Biosystems社製、カリフォルニア、米国）に吸着させ、プロテインブロッカー（登録商標）473Aシステム（Applied Biosystems社製）を用いて、アミノ酸配列の解析を行なった。用いた蛋白量は、 $25 \text{ kDa}$  GAFが $60 \text{ pmol}$ 、 $29 \text{ kDa}$  GAFが $5 \text{ pmol}$ 、 $30 \text{ kDa}$  GAFが $5.5 \text{ pmol}$ であった。得られた配列の結果を以下に記す。

1 5 10 15 16  
 25 kDa Ala-Asp-Z2-Leu-Gly-Gln-Ser-Glu-Ala-Gly-Gly-Leu-Pro-X-Gly-Pro-  
 20 21  
 Ala-Val-Thr-Asp-Leu- (配列番号: 3)  
 1 5 6 7 10 13  
 29 kDa X-Gln-Asp-Ala-Val-Pro-Phe-Gly-Asn-Val-Pro-(Ser)-Leu- (配列番  
 号: 4)  
 1 5 10 15 16  
 30 kDa Z2-Gly-Glu-Val-Gly-Asn-Tyr-Phe-Gly-Val-Gln-Asp-Ala-Val-Pro-Phe  
 20 23  
 -Gly-Asn-Val-(Pro)-X-Leu-Leu- (配列番号: 5)

Z1=HisまたはProを示す。

Z2=LeuまたはAlaを示す。

X:未同定のアミノ酸

( ): 確定できなかったが推定されたアミノ酸

最初のフラップのアミノ酸 (N末端アミノ酸) および10番目を超えるアミノ酸については確実性に乏しい。

#### 【0053】実施例5

GAF cDNAのクローニングとその塩基配列を解析  
 実施例3で得られた30 kDa GAFのアミノ酸配列を  
 もとに、この配列に対応し、かつ制限酵素の認識配列を  
 付加した下記のオリゴヌクレオチドプライマー2本 (p  
 rimer 1, 2) を合成した。

1 5 10  
 30 kDa GAF Z2-Gly-Glu-Val-Gly-Asn-Tyr-Phe-Gly-Val-  
 primer 1: 5' -AAGGATCGTGGGGAACCTATTTTCG  
 11 15 20 23  
 Gln-Asp-Ala-Val-Pro-Phe-Gly-Asn-Val-(Pro)-X-Leu-Leu  
 Primer 2: 5' -AAGAAATTCACRTTCCRAATGGIAC-3' (配列番号: 7)  
 Z2=Leu または Ala を示す。 I: Inosine Y=C, R=A G

このプライマーを用いてヒトゲノム由来DNAをテンプレ  
 ートとしてPCR (polymerase chain reaction) 反応 (Mullis, K. Bと  
 Faloora, F. A. メソサップ・イン・エンザイモ  
 ロジィ (Academic press) 155巻, 3  
 35頁, 1987) を行った。(GeneAmp (登録  
 商標) DNA Amplification Reag  
 ent Kit (シエタス社, 米国) ゲノムDNA 1μ  
 gに対して、プライマー-1, 2をそれぞれ560ng加  
 え、100μlの反応液中にAmp1i Taq (登録商  
 標) (シエタス社, 米国) 2.5ユニットを添加して9  
 4℃1分、50℃2分、72℃3分のDNA合成サイ  
 クルを25回くり返した。この反応物について、アクリル  
 アミドゲル電気泳動を行い予測される長さ (63bp) の  
 断片を回収し、その塩基配列を解析したところ、下記の  
 配列が得られた。

5'-GGATCCGTGGGGAACCTATTTTCG  
 GGGTGCAGGATGCGGTCCCTTTCGG  
 CAACGTGAATTTC-3' (配列番号: 8)

この配列をもとにして再度、下記のプローブ2本 (p  
 robe 1, 2) を化学合成した。

probe 1 5'-TGGGGAACCTATTTTCG  
 GGGTGCAGGATGCGG-3' (配列番号:  
 9)

probe 2 5'-ACGTTGCCGAAGGGG  
 ACCGCATCCTGCACC-3' (配列番号: 1

0)

一方ヒト包皮由来初代培養細胞mRNAより合成したc  
 DNAをpCDベクター (Okayamaら, モレキュ  
 ラー・セル・バイオロジー (Molecular Ce  
 ll Biology), 3, 280 (1983) 参  
 照) に組み込んで作成した大腸菌x1776を宿主とし  
 たcDNAライブラリーをNational Institute of Child Health and  
 Human Development, Bethes  
 da, U. S. Aの岡田博士より分与を受けた。このc  
 DNAライブラリーよりアルカリ法 (Birnbom  
 m. H. C. & Doly, J. スクレンジック・アッシ  
 ス・リサーチ (Nucleic Acids Resea  
 rch), 1, 1513 (1979) ) でプラスミドD  
 NAを抽出し、このDNAを大腸菌DH1に感染させ、  
 約 $2 \times 10^5$ 個のcloneよりなる大腸菌DH1を宿  
 主としたcDNAライブラリーを作成した。

【0054】上記大腸菌DH1を用いたcDNAライブ  
 ラリーをニトロセルロースフィルター (ミリポア社, H  
 ATEフィルター) 上に約 $1 \times 10^5$  clone/フィ  
 ルターとなるように10枚まき、このフィルターをバス  
 ターフィルターとしている各2枚ずつを1組としたレブ  
 リカフィルター計20枚を作成した。このレブリアフィ  
 ルター上の大腸菌を0.5N NaOH溶液で溶かし、  
 露出変性したプラスミドDNAをフィルター上に固定し  
 た [Crunstein, M. & Hogness,



D. S., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 8961 (1975)]

【0055】前記化学合成したprobe 1, 2についてT4ポリヌクレオチルキナーゼと $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATPとにより、5'末端に $^{32}\text{P}$ を導入し、これらをプローブとして別々にDNAを固定したニトロカフマニスターに結合させると、結合反応は、 $10\mu\text{Ci}$ のプローブを含む $5\times\text{SSPE}$  [ $180\text{mM NaCl}$ ,  $10\text{mM NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $1\text{mM EDTA}$  (pH 7.4)],  $5\times\text{Denhardt's}$ ,  $0.1\%$  SDS,  $100\mu\text{g}$  阻変性ヤシ種子DNA溶液  $10\text{ml}$  中で、 $55^\circ\text{C}$  16時間行い、反応後ツェンターを $5\times\text{SSC}$  [ $0.15\text{M NaCl}$ ,  $0.015\text{M Sodium citrate}$   $0.1\%$  SDS] 溶液で室温で3回さらし、 $60^\circ\text{C}$  30分ずつ2回洗浄した(T. maniatis, "Molecular Cloning" Cold Spring Harbor Laboratory, P. 309 (1982))。

【0056】洗浄したツェンターよりラミテサートコラムを取り、二種類のプローブの両方に対して反応する菌株を二組は枚のニトロカフマニスターからラミテサートコラムを重ね合わせるにより探した。この方法により $1\times 10^6$  コロンより二種類のプローブに対して反応する2株を得た。これら2株よりプラスミドDNAをアルコール法(前出)によって抽出精製した。プラスミドDNA中のcDNA部分を制限酵素BamHIにより切り出し、アコースティック電気泳動で分離すると、2株由来のcDNAはいずれも約1.55Kbの同鎖長を示した。従って、この2株は同じものであると考えられた。この2株の一方の菌株(Escherichia coli DH-1-pGAF1)に含まれるプラスミド中のcDNA部分の塩基配列を自動化学シークレンス法合成鎖停止法(J. Messing, スクレーン・アミノ・リサーチ, 9, 309 (1981))によって決定した。その塩基配列(配列番号: 2)および塩基配列から推定されるアミノ酸配列(配列番号: 1)を図19に示した。pGAF1に含まれるcDNA部分は1493bpであり、5'側非翻訳領域、全アミノ酸コード領域、3'側非翻訳領域及びpolyA鎖を含んでいた。コードされていたアミノ酸配列は208アミノ酸であり、この配列中にN末端配列分析(実施例4)により明らかにされた30kDa、29kDa、25kDaの部分アミノ酸配列はすべて含まれていた。一部(25kDaの1位のAla、29kDaの12位のSer、30kDaの23位のLeu)、蛋白質のアミノ酸分析(実施例4)で得られた配列と相異するアミノ酸配列がコードされているが、相異点はいずれもアミノ酸配列分析で不確実な結果を与えやすいN末端、あるいは10残基を超えて固定された部分であり、cDNAより推定された配列の方が正しいものと考えられる。

【0057】実施例6 GAFをコードする遺伝子の動物細胞における発現

(1) GAFがCOS-7細胞での発現

COS-7細胞を10%NU-Serum (Collaborative Research社)を含むIMDM培地でフアルコ径6.0mmフラスコ(クマシマ社)に1枚当り $6\times 10^5$ 個播種した。翌日血清フリーIMDM培地で洗浄後、公知の方法(B. Seed, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 52: 3365 (1987))に従い、プラスミドpGAF1のDNA  $2\mu\text{g}$ 及び $10\mu\text{g}$ と $400\mu\text{g/ml}$ のDIAF-dextranとを含む反応液を調製し細胞に添加した。 $37^\circ\text{C}$ で4時間インキュベーションした後2分間DMSO処理を行った。その後10%NU-Serumを含む培地(3ml/ディッシュ)で培養を続け、70~72時間後に産生されたGAFを含む培地を集めた。さらにディッシュあたり1.5ml/ディッシュの生理食液中に細胞を回収してpGAF1をトランスフェクトしたCOS-7細胞の培養上清中にGAF細胞増殖促進活性が検出された。GAF-cDNAが含まれていないプラスミドはプラスミドpCDXをトランスフェクトしたCOS-7細胞、またトランスフェクトしない細胞の培養上清中には活性は検出されなかった(420)。凍結融解を2度および超音波処理をして得られた細胞抽出液中にはコントロールと比べて有意な活性はなかった。この結果からpGAF1のcDNAがGAFをコードしていることが確認されるとともに、COS細胞でcDNAを発現させると産物は培養液中へ分泌されることが明らかとなった。

【0058】(2) GAFのCHO細胞での発現

(a) 発現用プラスミドpDGAF1の構築

前記実施例5で得られたGAFの全構造を含むプラスミドpGAF1を制限酵素BamHIで切断し、1.55kbのcDNA断片を単離した。一方、動物細胞用ベクターpTB399 (セル・ストラクチャー・アンド・ファンクシオン(Cell Struct. Funct. 12: 205 (1987))を制限酵素BamHIで切断し1.2cDNA領域を除いた後、前記のGAF-cDNA (1.55kb断片)を挿入して、Abelson マウス白血病ウイルス(MuLV) LTRの支配下に動物細胞でGAF-cDNAを発現させ得る発現用プラスミドpRGB12を構築した。さらに、これを制限酵素SalI-HindIIIで切断して発現ユニット部分(プロモーター-遺伝子-ポリ

(A) シグナル)をハムスター胚上胚盤着細胞系(DHFR)発現用プラスミドpTB348 (セル・ストラクチャー・アンド・ファンクシオン(Cell Struct. Funct. 12: 205 (1987))のSV40プロモーター上流にあるSalI-HindIII部位に挿入して、プラスミドpDGAF1を構築した。プラスミドpDGAF1の構築図を図21に示す。

## 【0059】(b) CHO細胞における発現

CHO (dhfr<sup>-</sup>) 細胞を10%牛胎児血清を含むHam F12培地で直径6 cmの組織培養用フラスコに播種し、翌日、同培地で培地を換した。2時間後にリン酸カルシウム法 (Graham 法、ウィロロジー (Virology) 52, 456 (1973)) によりプラスミド pDGAF1-DNA 10  $\mu$ g をトランスフェクトした。2日間、増殖培地で培養した後、細胞を3.5  $\mu$ g/ml プラズミンと10%透析FCSを含むDMEM培地で96穴マイクロプレート (Nunc社) にまき直し、3~4日毎の培地交換を行い、つかりdhfr<sup>-</sup> 形質転換体を選択した。これらを3.5  $\mu$ g/ml プラズミンと5%FCSを含むDMEM培地で24穴マイクロプレート (Gibco, Flow社) に移し、各クローンを培養した。以後、用いた培地は3.5  $\mu$ g/ml プラズミンと5%FCSを含むDMEM培地である。これらのクローンのうちGAFタンパクを産生している16クローンを6 cmの組織培養用フラスコに移し、メトトレキサート (MTX) 濃度を3段階 (0, 1, 1, 10  $\mu$ M) に上げながら、10  $\mu$ M MTX耐性株を取得しGAF遺伝子の増幅をはかる。各クローンの培養上清に含まれるGAF活性を図22に示す。図中、横軸は添加した培養上清の希釈率を示している。GAF活性の高いクローンを選択し、糖鎖の付加した天然型GAF産生細胞として確立し、GAFの採取等に用いる。

## 【0060】実施例7 GAF遺伝子導入によるマウス

BALB/c 3T3細胞の形質転換

## (1) GAF発現用プラスミドpRGB12の構築

実施例6に記載したプラスミドpRGB12をGAF発現用プラスミドとした。コントロールのプラスミドとしては、GAF cDNAインサートのないプラスミドpTB1055を用いる。

## (2) BALB/c 3T3細胞の形質転換

マウスBALB/c 3T3 clone A31 (サブクローンA31-1-1 (Kakunaga 法、サイエンス (Science) 204, 505 (1980))、Dr. K. Kakunaga より分与を受けた) を10%牛血清を含むDMEM培地で直径6 cmの組織培養用フラスコに1×10<sup>6</sup>個播種し、翌日、同培地で培地を換した。3時間後にリン酸カルシウム法 (Graham 法、ウィロロジー (Virology) 52, 456 (1973)) によりプラスミドpRGB12あるいはpTB1055を1, 2, 5および10  $\mu$ g、それぞれトランスフェクトした。37℃で4時間インキュベーションした後、15%グリセロールを含むPBS溶液で3分間刺激した。5%牛血清を含むDMEM培地で3~4日毎に半量培地交換を行いながら4週間培養を続けた。培養終了後、培地を捨て、氷冷スターンを加え15分間細胞を固定した。水洗後、ギムザ溶液で20分間染色した。ギムザを水洗、風乾後、染色されたフોーカスを数え、その結果を表2に示す。GAF遺伝子には、はっきりとした形質転換性があることがわかった。

## 【0061】

表2 GAF遺伝子導入によるA31細胞のフォーカス形成

プラスミド	トランスフェクトしたDNA量 ( $\mu$ g)				
	0	1	2	5	10
pTB1055	0*	N. T.	0	N. T.	0
pRGB12	0	3	28	25	33

\*: ティンシュウ当りのフォーカス数

N. T.: 未検計

## 実施例8

## (1) GAFの大腸菌での発現

(a) GAF発現用プラスミドpETGAF1の構築  
前記実施例5で得られたGAFの全構造遺伝子を含むプラスミドpGAF1を制限酵素KpnI-BamHIで切断し、1.25 kbのcDNA断片を単離した。一方、1.7 kbのローターを含むプラスミドpET3-cを制限酵素NdeI-BamHIで切断し、4.6 kbのDNAを単離し、そこに前記GAF cDNA 1.25 kb断片と、精製GAFタンパクN末端のLeuの前Me1が来る様に合成したDNA断片 (NdeI-KpnI) (配列番号11) および (配列番号12)) を挿入して、1.7 kbのローターの支配下に、GAF cDNAを発現させる発現用プラスミドpETGAF1を構築した。プラスミドpETGAF1の構築図を図23に示す。このプラスミドを用いて大腸菌MM294

(DE3) にpLysSを形質転換することにより、GAFを発現する形質転換体E. coli MM294 (DE3) -pLysS, pETGAF1を得た。得られたMM294 (DE3) -pLysS, pETGAF1をLB培地で培養し、インデロビル- $\beta$ -D(-)-チオガラクトシド (和光純薬 (株)、日本) で発現を誘導した後、培養液200  $\mu$ l 相当の菌体を抽出蛋白質をGAF蛋白質のN末端部分を認識するウサギ抗GAFポリクローナル抗体 (1:500倍希釈) を用いウエスタンブロッティング法により調べると、特異的なバンドが確認された (図24)。GAF cDNAが含まないプラスミドpET3-cによる形質転換体MM294 (DE3) -pLysS, pET3-cではこのバンドは産生されない。

## 【0062】(2) 大腸菌で産生させたGAF (rhGAF) の抽出

E. coli MM294 (DE3) -pLysS, pETGAF1を50  $\mu$ g/ml のアンピシリンおよび10

$\mu\text{g}/\text{ml}$ のクロラムフェニコールを含むLBメデイウム中にて $37^\circ\text{C}$ で振とう培養した。培養液の $\text{Klett}$ 値が120に達した時点でイソプロピル- $\beta$ -D-1-thio-ガラクトシドを最終濃度 $0.4\text{ mM}$ になるように添加し、さらに $37^\circ\text{C}$ にて3.5時間振とう培養した。1リットルの培養液より、遠心(6,000回転/分、10分間)により集めた菌体を、氷上にて、 $80\text{ ml}$ の $2\text{ mM}$  (pH 7.6)のメタンスルホニウムイソシアネート・ナトリウムライト(和光純薬(株)、日本)、 $100\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ の卵白リゾチーム(生化学工業株式会社、東京)、および $0.1\text{ M}$ 食塩を含む $20\text{ mM}$ トリス塩酸緩衝液で懸濁させ $4^\circ\text{C}$ にて1時間置いた後、 $37^\circ\text{C}$ で3時間、キヤベ-1した。その懸濁液を、氷で冷却して超音波処理 (BRANSON 社製、SONIFIER (登録商標)、米国、CELL DISRUPTOR 200 出力8にて2分間)した。大腸菌抽出物を17,000回転/分、40分間の遠心により得た。

【0063】(3)大腸菌が産生するヒトGAF (rhGAF)の精製

ステップ1: 硫酸沈殿

1リットルの培養液より得られた $80\text{ ml}$ の大腸菌抽出物に $27\text{ ml}$ の飽和硫酸アンモニウム水溶液を添加混合後、 $4^\circ\text{C}$ にて1昼夜放置した。その後17,000回転/分、40分間の遠心にて上清を得た。

ステップ2: 疎水カラムクロマトグラフィー

ステップ1で得られた $100\text{ ml}$ の遠心上清を、あらかじめ $25\%$ 飽和硫酸を含む $20\text{ mM}$ トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)で平衡化した Butyl-Toyopearl 650 M (セパト容積 $50\text{ ml}$ 、内径 $2.5\text{ cm}$ 、長さ $10\text{ cm}$ 、東洋株式会社製、東京)に通した(80 ml/時間、 $4^\circ\text{C}$ )。12.5%飽和硫酸と $2\text{ mM}$  a PMSFを含む $20\text{ mM}$ トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)で充分塩体を洗浄後、15%グリセリン、0.1%CHAPS および $2\text{ mM}$  a PMSFを含む $20\text{ mM}$ トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)で rhGAF 蛋白を含む画分を得た

(80 ml/時間、10 ml/フラクション、 $4^\circ\text{C}$ )

(図25)

ステップ3: ヒトリアアミノ酸アミド高速液体カラムクロマトグラフィー

ステップ2で rhGAF 蛋白を含む画分 (フラクション24から47)をブールした(40 ml)。より40 mlの溶液のうち $36\text{ ml}$ を、HR-894 (内径 $8\text{ mm}$ 、長さ $50\text{ mm}$ 、昭和電工、日本)を装置した高速液体クロマトグラフィー (Gilson Medical Electronics社製、フランス)にかけた。レシに吸着したたんぱく質は、 $\text{NaCl}$ の濃度を直線的に上昇させることにより、流速 $2\text{ ml}/\text{分}$ で溶出し画分 (2 ml/フラクション)した。用いた緩衝液はAが $0.4\text{ M}$   $\text{NaCl}$ 、 $0.1\%$  CHAPS と15%グリセリンを含む $10\text{ mM}$ トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)で、Bが $2\text{ M}$   $\text{NaCl}$ 、 $0.1\%$  CHAPS と15%グリセリンを含む $10\text{ mM}$ トリス塩酸緩衝液 (pH 7.6)である。溶出しプログラムは次に記すとおりで行った。すなわち0分(100%A)→70分(75%A+25%B)→75分(100%B)→80分(100%B)→85分(100%A)として行った(図26)。カラム温度は室温であった。

【0064】蛋白の溶出画分の $1\text{ }\mu\text{l}$ を2-メルカプトエタノール存在下でSDS-ポリアクリルアミド電気泳動し(ゲル濃度12.5%)、銀染色した結果を図27に示す。食塩濃度を上昇させることにより溶出されてきた画分は、 $27\text{ kDa}$ の単一なバンドを与えた。またこの $27\text{ kDa}$ たんぱくはN末端部分と結合するウサギ抗GAFポリクローナル抗血清で認識された。(図28)。フラクション27から42をブールした。

【0065】(4)精製の要約

1リットルのE. coli MM294 (DE3) p pLys S, pETGAF1培養液から出発した rhGAF の精製の要約を表3に記す。

表3

サンプル	全たん白量	全活性	比活性	活性回収率	精製倍数
	(mg)	(U)	(U/mg)	(%)	
大腸菌抽出物	672	$4.16 \times 10^7$	$6.19 \times 10^1$	100	1
25%飽和硫酸上清	210	$4.35 \times 10^7$	$2.07 \times 10^2$	105	3.3
Butyl-Toyopearl	37.6	$4.10 \times 10^6$	$1.09 \times 10^5$	10	1.8
ヒトリアアミドHPLC	4.5	$3.31 \times 10^6$	$7.35 \times 10^5$	8.0	12

生物活性は、参考例1に記載した方法で行った。生物活性の単位はトリチウムチミジンの50%取り込み値を示す単位である希釈率の逆数とした。なお、トリチウムチミジンで100%取り込み値は、10%ウシ胎児血清により誘導される値とした。蛋白質量はMicro BCA キット (PIERCE社製、米国)により、ウシ血清アルブミンを対照にして算定した。

【0066】

実施例9 因子の各種培養細胞に対する作用(2)

(1)クリア細胞に対する増殖促進活性

実施例8-(3)に記載した方法で得られた rhGAF は、クリア細胞に対し増殖促進活性を有している(図29)。図中横軸はGAF濃度を示す。なおクリア細胞に対する増殖促進活性の測定方法については、参考例1に

記載した方法に従って行った。

## (2) 線維芽細胞に対する増殖促進活性

実施例8-(1)に記載した方法で得られたrhGAFは、線維芽細胞マウスBALB-3T3 clone A3.1細胞に対し増殖促進活性を有していた(図3.0)。図中横軸はGAF濃度を示す。なお線維芽細胞A3.1に対する増殖促進活性の測定については、実施例2-(4)に記載した方法に従って行った。

## (3) ラット血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性

実施例8-(1)に記載した方法で得られたrhGAFは、ラット血管平滑筋細胞に対し増殖促進活性を有していた(図3.1)。図中横軸はGAF濃度を示す。なおラット血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性の測定については、以下に記載する方法で行った。ラット初代培養血管平滑筋細胞を10%胎牛血清を含むイーグルMEM培地で2×10<sup>6</sup>個のライオンコートウェルプレート(48底)に1あたり0.3×10<sup>3</sup>個を100μlの培地に挿入して培養した。翌日、各ウェルより80μlの培地を廃棄し、各ウェルに血清を含まないイーグルMEM培地を180μl添加した。2日間培養した後も各ウェルより20μlの培地を廃棄した。その後、0.1%の血清アルブミンを含むDMEM培地で適量に希釈したテストサブスタンスの20μlを各ウェルに添加後、1晩培養した。翌朝、各ウェルに1μCiのトリチウムチミン(5Ci/mmol, 1mCi/ml, RCC-Amersham)を添加後、さらに5時間培養した。培養後、各ウェルの培地を廃棄後、各ウェルに100μlの0.5トリジンと0.01%EDTAを含むPBSを添加し、数分の間室温にて放置した。顕微鏡で細胞が存続していることを確認した後、各細胞をタイマーカウンタースター(Hewlett-Packard社製、Virginia, USA)を用いてガラスファイバーフィルター(大日本製薬株式会社製)上に集めて洗浄後、細胞に取り込まれたトリチウムチミンのカウンタースターカウンタースターにて測定した。

## 【0067】

### (4) ヒトさい帯血管内皮細胞に対する作用

実施例8-(1)に記載した方法で得られたrhGAFは、ヒトさい帯血管内皮細胞に対して増殖促進活性を有していなかった(図3.2)。図中横軸はGAFまたはbFGFのたん白濃度を示す。なおヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性の測定については、実施例2-(5)に記載した方法に従って行った。

## 【0068】

### (5) rhGAFの巨核球系コロニー刺激因子活性

BALB/c系マウス骨髄細胞は、20%ワシ胎児血清(FCS)含有イソラジ改良ダルベコ培地(IMDM)に2×10<sup>5</sup>個/mlとなるように懸濁し、FCSをコートしたガラスプレート培養皿中で37℃、1時間イ

ンキュベーションして付着性細胞を除去した。得られた非付着性骨髄細胞は、IMDMで3回洗浄した後実験に供した。細胞を1%NeutridomaSP(bio-rringer mannheim社)含有IMDMに懸濁し、ヒトインターフェロンGAF(rhGAF)とともに1×10<sup>5</sup>個ずつ96穴平底プレートに接種した。rhGAFは0.6M NaCl, 15%グリセリン, 0.1%CHAPS, 10mM Tris-HCl (pH7.6)に125μg/ml溶解したものをIMDMで希釈して使用し、GAFを含まない緩衝液も同様に希釈して実験系に添加した。また、ポリメチルメタクリレートとしてマウスリコンビナントIL-3(mrIL-3)(Genzyme社)を用いた。これを、37℃、5%CO<sub>2</sub>を含む空気存在下で4日間培養した。その後、5mg/ml MTT (SIGMA社)含有PBS溶液を20μl添加し、37℃で5時間培養した。10%SDS, 0.01N HCl溶液を100μl添加し、37℃でさらに1晩インキュベーションした後、590nmの吸光度を測定し、骨髄細胞の増殖を調べ、図3.3に示した。一方、同様に調製した細胞を37℃、5%CO<sub>2</sub>を含む空気存在下で7日間培養した。5%グルタルアルデヒド含有PBS溶液を50μl添加して2000rpmで5分間遠心し、細胞を固定した。0.1Mリノ酸緩衝液(pH6.0)で一度洗浄後、アセチルコリンエステラーゼ染色(緩生化学実験講座「8 血液」を、149頁参照)にて巨核球を染色し、ウェルあたりの巨核球数を倒立顕微鏡下で数え、図3.4に示した。これらの結果から、rhGAFにはマウス骨髄細胞を増殖させる活性があること、さらに骨髄細胞中の巨核球系に作用してこの細胞を増殖分化させる活性があることが明らかとなった。

## 【0069】

## 【0070】

### 【配列表】

配列番号(SEQ ID NO): 1

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 208

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸(amino acid)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状(linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): タンパク質(protein)

ハイポセティック配列(HYPOTHETICAL): No

起源(ORIGINAL SOURCE)

生物名(Organism): Homo sapiens

ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n

組織の種類(TISSUE TYPE): skin

細胞の種類(CELL TYPE): fibroblast

直接起源(IMMEDIATE SOURCE):

ライブラリー名(LIBRARY): Human foreskin cDNA library

クローン名(CLONE): pGAF1

配列:

Met Ala Pro Leu Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala  
                   5                  10                  15  
 Val Pro Phe Gly Asn Val Pro Val Leu Pro Val Asp Ser Pro Val Leu  
                   20                  25                  30  
 Leu Ser Asp His Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Arg Gly  
                   35                  40                  45  
 Pro Ala Val Thr Asp Leu Asp His Leu Lys Gly Ile Leu Arg Arg Arg  
                   50                  55                  60  
 Gln Leu Tyr Cys Arg Thr Gly Phe His Leu Glu Ile Phe Pro Asn Gly  
                   65                  70                  75                  80  
 Thr Ile Gln Gly Thr Arg Lys Asp His Ser Arg Phe Gly Ile Leu Glu  
                   85                  90                  95  
 Phe Ile Ser Ile Ala Val Gly Leu Val Ser Ile Arg Gly Val Asp Ser  
                   100                  105                  110  
 Gly Leu Tyr Leu Gly Met Asn Glu Lys Gly Glu Leu Tyr Gly Ser Glu  
                   115                  120                  125  
 Lys Leu Thr Gln Glu Cys Val Phe Arg Glu Gln Phe Glu Glu Asn Trp  
                   130                  135                  140  
 Tyr Asn Thr Tyr Ser Ser Asn Leu Tyr Lys His Val Asp Thr Gly Arg  
                   145                  150                  155                  160  
 Arg Tyr Tyr Val Ala Leu Asn Lys Asp Gly Thr Pro Arg Glu Gly Thr  
                   165                  170                  175  
 Arg Thr Lys Arg His Gln Lys Phe Thr His Phe Leu Pro Arg Pro Val  
                   180                  185                  190  
 Asp Pro Asp Lys Val Pro Glu Leu Tyr Lys Asp Ile Leu Ser Gln Ser  
                   195                  200                  205

【0071】配列番号(SEQ ID NO) : 2  
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH) : 1493  
 配列の型(SEQUENCE TYPE) : 核酸 (nucleic acid)  
 鎖の数(STRANDEDNESS) : 二本鎖 (double)  
 トポロジ- (TOPOLOGY) : 直鎖状 (linear)  
 配列の種類 (MOLECULE TYPE) : cDNA to mRNA  
 ハイボセティカル配列(HYPOTHETICAL) : No  
 アンチセンス (ANTI-SENSE) : No  
 起源 (ORIGINAL SOURCE)

生物名 (ORGANISM) : Homo sapiens  
 ハプロタイプ (HAPLO TYPE) : 2n  
 組織の種類 (TISSUE TYPE) : skin  
 細胞の種類 (CELL TYPE) : fibroblast  
 直接起源 (IMMEDIATE SOURCE) :  
 ライブラリー名 (LIBRARY) : Human foreskin cDNA libra  
 ry  
 クローン名 (CLONE) : pGAF1

配列:

TGAAACAGCA GATTACTTTT ATTTATGCAT TTAATGGATT GAAGAAAAGA ACCTTTTTTT 60  
 TTCTCTCTCT CTCTGCAACT GCAGTAAGGG AGGGGAGTTG GAATACCTC GCCTAATATC 120  
 TCCTGGGTTG ACACCATCAT TATTGTTTAT TCTTGCTCTC CAAAAGCCGA GTCCTCTGAT 180  
 GGCTCCCTTA GGTGAAGTTG GGAACATATT CGGTCTGCAG GATCGGTAC CGTTTGGGAA 240  
 TTGCCCCGTG TTGCCGGTGG ACAGCCCGGT TTTGTTAAGT GATCACCTGG GTCAGTCCGA 300  
 AGCAGGGGCG CTCCCAGGGG GACCCCGCAGT CACGGACTTG GATCATTTAA AGGGGATTCT 360  
 CAGGCGGAGG CAGCTATACT GCAGGACTGG ATTTCACCTA GAAATCTTCC CCAATGGTAC 420  
 TATCCAGAGA ACCAGGAAAG ACCACAGCCG ATTGGGCTTT CTGGAATTTA TCAGTATAGC 480  
 AGTGGGCTTG GTCAGCATTC GAGGCGTGGG CAGTGGACTC TACCTCGGGA TGAATGAGAA 540  
 GGGGCGAGCTG TATGATCAG AAAAATAAC CCAAGAGTGT GTATTCAGAG AACAGTTCGA 600  
 AGAAACTGG TATAATACGT ACTCGTCAA CCTATATAAG CACGTGGACA CTGGAAGGCG 660  
 ATACTATGTT GCATTAAATA AAGATGGGAC CCCGAGAGAA GGGACTAGGA CTAAACGGCA 720  
 CCAGAAATTC ACACATTTTT TACCTAGACC AGTGGACCCC GACAAAGTAC CTGAACGTGA 780  
 TAAGGATATT CTAAGCCAAA GTTGACAAAG ACAATTTCTT CACTTGAGCC CTAAAAAAG 840

TAACCACIAT AAAGGTTTCA CCGGTGGGT TCTTATTGAT TCGTGTGTC ATCACAATCAG 900  
 CTCCACIGTT GCCAACTTT GTCCATGCA TAACTAIGA TGGAGCCTTG GATGGGAATA 960  
 TGCTGAHTT GTTCTGCACT TAAAGGCTTC TCCTCTGGA GGGCTCCIA GGGCCACTTG 1020  
 CTTGATTAT CATGAGAGAA GAGGAGAGAG AGAGAGACTG AGCCTAGGA GTGTGTGTAT 1080  
 GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT GTGTGTGTGT ATGTGTGTAG CGGAGATGT GGGCGGAGCG 1140  
 AGAGCAAAAG GACTGCGGCC TGATGCATGC TGGAAAAAGA CAGCCTTTC ATTTCTGATC 1200  
 AGTTGTACTT CATCCATAT CAGCACAGCT GCCATACCT GACTTATCAG GATTCGGCT 1260  
 GGTGGCTGC GCGAGGTGC AGTCTTACTT AAAAGACTT CAGTTAATTC TCACGGGTAT 1320  
 CATGCGAGTG AACTTAAAC AAAGACCTCT TAGTAAAAA TAAAAAATAA 1380  
 AATAAAAAA AGTTAAATTT ATTTATAGAA ATTCCAAAA AAAAAAATAA 1440  
 AAAAAAATAA AAAAAAATAA AAAAAAATAA AAAAAAATAA AAAAAAATAA AAA 1493

【0072】配列番号(SEQ ID NO): 3

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 21

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸 (amino acid)

鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): タンパク質 (protein)

ハイポセタイカル配列(HYPOTHETICAL): No

アンチセンス(ANTI-SENCE): No

フラグメント型(FRAGMENT TYPE): N-terminal fragment

起源(ORIGINAL SOURCE)

配列:

Ala Asp Xaa Leu Gly Gln Ser Glu Ala Gly Gly Leu Pro Xaa Gly Pro  
 5 10 15

Ala Val Thr Asp Leu  
 20

【0073】配列番号(SEQ ID NO): 4

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 13

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸 (amino acid)

鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): タンパク質 (protein)

ハイポセタイカル配列(HYPOTHETICAL): No

アンチセンス(ANTI-SENCE): No

フラグメント型(FRAGMENT TYPE): N-terminal fragment

起源(ORIGINAL SOURCE)

配列:

Xaa Gln Asp Ala Val Pro Phe Gly Asn Val Pro (Ser) Leu  
 5 10

【0074】配列番号(SEQ ID NO): 5

配列の長さ(SEQUENCE LENGTH): 23

配列の型(SEQUENCE TYPE): アミノ酸 (amino acid)

鎖の数(STRANDEDNESS): 一本鎖 (single)

トポロジー(TOPOLOGY): 直鎖状 (linear)

配列の種類(MOLECULE TYPE): タンパク質 (protein)

ハイポセタイカル配列(HYPOTHETICAL): No

フラグメント型(FRAGMENT TYPE): N-terminal fragment

起源(ORIGINAL SOURCE)

生物名(ORGANISM): Homo sapiens

配列:

生物名(ORGANISM): Homo sapiens

ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n

組織の種類(TISSUE TYPE): brain

細胞の種類(CELL TYPE): glioma

セルライン(CELL LINE): NMC-G1

配列の特徴(FEATURE)

特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD): E

3 Xaa= His または Pro

11 Xaa= undetermined

生物名(ORGANISM): Homo sapiens

ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n

組織の種類(TISSUE TYPE): brain

細胞の種類(CELL TYPE): glioma

セルライン(CELL LINE): NMC-G1

配列の特徴(FEATURE)

1 Xaa = undetermined

12 (Ser) = predicted

特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD): E

ハプロタイプ(HAPLO TYPE): 2n

組織の種類(TISSUE TYPE): brain

細胞の種類(CELL TYPE): glioma

セルライン(CELL LINE): NMC-G1

配列の特徴(FEATURE)

1 Xaa= Leu または Ala

20 (Pro) = predicted

21 Xaa = undetermined

特徴を決定した方法(IDENTIFICATION METHOD): E

Xaa Gly Glu Val Gly Asn Tyr Phe Gly Val Gln Asp Ala Val Pro Phe  
 5 10 15  
 Gly Asn Val (Pro) Xaa Leu Leu  
 20

【0075】配列番号(SEQ ID NO):6  
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):25  
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)  
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)  
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)  
 配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
 ハイボセティカル配列(HYPOTHETICAL):Yes  
 アンチセンス(ANTI-SENSE):No  
 配列の特徴(FEATURE)  
 11,14 I = inosine

配列:  
 AAGGATCCGT TGGTAAATAT TTYG- 25

【0076】配列番号(SEQ ID NO):7  
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):25  
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)  
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)  
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)  
 配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid)

配列:

GGATCCGTTG GGAATATTT CGGGGTGCAG GATGCCGTCC CTTCCGCAA CGTGAATTC 59

【0078】配列番号(SEQ ID NO):9  
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):30  
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)  
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)  
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)  
 配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
 ハイボセティカル配列(HYPOTHETICAL):Yes  
 アンチセンス(ANTI-SENSE):No

配列:  
 TGGGGAACIA TTTCGGGGTG CAGGATGCGG 30

【0079】配列番号(SEQ ID NO):10  
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):30  
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)  
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)  
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)

配列:

TAAGTTAGGT GAAGTTGGGA ACTATTTCCG GTGCGAGGAT GCGTAC 47

【0081】配列番号(SEQ ID NO):12  
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):41  
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)  
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)  
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)

配列:

CGCATCCTGC ACACCGAAAT AGTTCCCAAC TTCACCTAAC A 41

c acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
 ハイボセティカル配列(HYPOTHETICAL):Yes  
 アンチセンス(ANTI-SENSE):Yes  
 配列の特徴(FEATURE)

14,20,23 I = inosine

配列:

AAGAATTCAC RTTCCRAAI GGIAC 25

【0077】配列番号(SEQ ID NO):8  
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):59  
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)  
 鎖の数(STRANDEDNESS):二本鎖(double)  
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)  
 配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid)  
 (PCR product from genomic DNA)  
 ハイボセティカル配列(HYPOTHETICAL):No  
 アンチセンス(ANTI-SENSE):No  
 起源(ORIGINAL SOURCE)  
 生物名(ORGANISM):Homo sapiens

配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
 ハイボセティカル配列(HYPOTHETICAL):Yes  
 アンチセンス(ANTI-SENSE):Yes  
 配列:

ACGTTGCCGA AGGGGACCGC ATCCTGCACC 30

【0080】配列番号(SEQ ID NO):11  
 配列の長さ(SEQUENCE LENGTH):47  
 配列の型(SEQUENCE TYPE):核酸(nucleic acid)  
 鎖の数(STRANDEDNESS):一本鎖(single)  
 トポロジー(TOPOLOGY):直鎖状(linear)  
 配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
 ハイボセティカル配列(HYPOTHETICAL):No  
 アンチセンス(ANTI-SENSE):No

配列の種類(MOLECULE TYPE):他の核酸(other nucleic acid) 合成DNA(synthetic DNA)  
 ハイボセティカル配列(HYPOTHETICAL):No  
 アンチセンス(ANTI-SENSE):Yes

## 【図面の簡単な説明】

【図1】ヘパリンセファローズ（登録商標）CL-6Bカラムクロマトグラフィー（実施例1②ステップ1）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図2】セファールのS-200HRカラムクロマトグラフィー（実施例1③ステップ3）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図3】ヘパリンセファローズ（登録商標）CL-6Bカラムクロマトグラフィー（実施例1④ステップ4）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図4】HR-8.9.4ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグラフィー（実施例1⑤ステップ5）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図5】Vylac C4高速液体カラムクロマトグラフィー（実施例1⑥ステップ6）でのたん白と活性の溶出パターンを示す図である。

【図6】精製グリダ活性化因子（NMC-G1由来）のSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図である。

【図7】精製グリダ活性化因子のグリダ細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図8】NMC-G1由来精製グリダ活性化因子のグリダ細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図9】グリダ活性化因子（NMC-G1由来）によるグリダ細胞数の増加を示す図である。

【図10】グリダ活性化因子（NMC-G1由来）によるグリダ細胞へのトリチウムラベル取り込み促進の経時変化を示す図である。●はGAF添加群を○はGAF無添加のコントロール群を示す。

【図11】精製グリダ活性化因子（NMC-G1由来）の線維芽細胞マウスBALB/3T3 clone A31細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図12】NMC-G1由来精製グリダ活性化因子の線維芽細胞マウスBALB/3T3 clone A31細胞に対する増殖促進活性を示すグラフである。

【図13】精製グリダ活性化因子（NMC-G1由来）のヒトさい帯血管内皮細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図14】精製グリダ活性化因子（NMC-G1由来）のマウス副腎褐色細胞腫由来PC-12細胞株に対するトリチウム取り込み促進活性を示す図である。

【図15】グリダ活性化因子（NMC-G1由来）活性の熱・酸安定性を示すグラフである。

【図16】aFGF、bFGFとグリダ活性化因子（N

MC-G1由来）間の免疫学的交差性を示す図である。

【図17】GAF（NMC-G1由来）のビオチニル化コンジュガリンAおよびアビティンとビオチニル化ペルオキシターゼを用いた染色の図である。

【図18】GAF（NMC-G1由来）のN-グリカナーゼ処理の結果である。

【図19】GAFのcDNAの塩基配列とそれにより規定されるアミノ酸配列を示す図である。

【図20】pGAF1をCOS-7細胞で発現させ、グリダ細胞に対する増殖促進活性を測定した結果である。

【図21】プラスミドpDGAF1の構築を示す図である。

【図22】スクロースセード耐性CHO細胞培養上清中に含まれるGAF活性を示す図である。

【図23】プラスミドpETGAF1の構築を示す図である。

【図24】MM294（DE3）/pLysS、pETGAF1の抽出物中に含まれるrhGAFをウエスタンブロッティング法により染色した図である。

【図25】疎水カラムクロマトグラフィー（実施例7（3）ステップ2）でのたん白の溶出パターンを示す図である。

【図26】ヘパリンアフィニティー高速液体カラムクロマトグラフィー（実施例8（3）ステップ3）でのたん白の溶出パターンを示す図である。

【図27】精製rhGAFのSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動図である。

【図28】精製rhGAFをウエスタンブロッティング法により染色した図である。

【図29】精製rhGAFのグリダ細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図30】精製rhGAFの線維芽細胞株BALB/3T3 clone A31細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

【図31】精製rhGAFのマウス血管平滑筋細胞に対する増殖促進活性を示す図である。

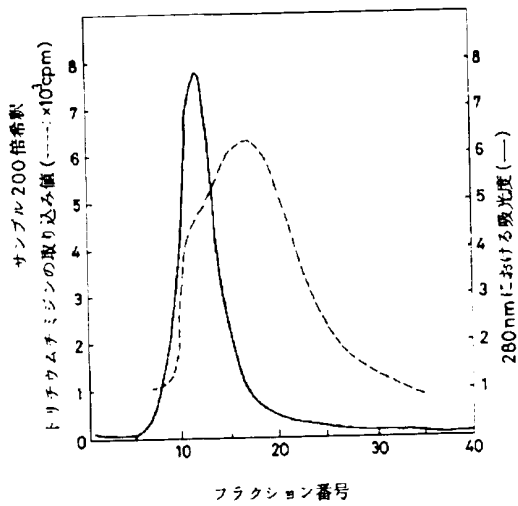
【図32】精製rhGAFのヒトさい帯血管内皮細胞増殖に対する作用を示す図である。

【図33】精製rhGAFのマウス骨髄細胞増殖に対する作用を示す図である。

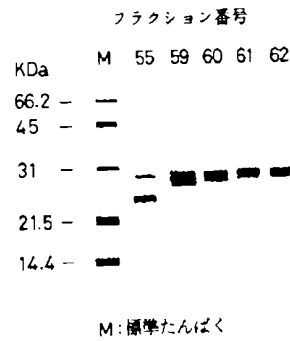
【図34】精製rhGAFのマウス骨髄細胞中粒芽球に対する作用を示す図である。



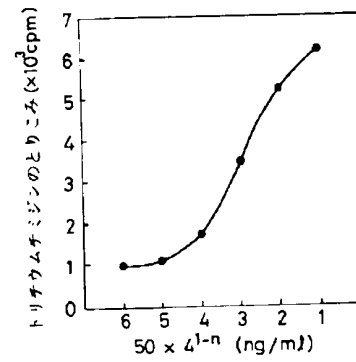
【図1】



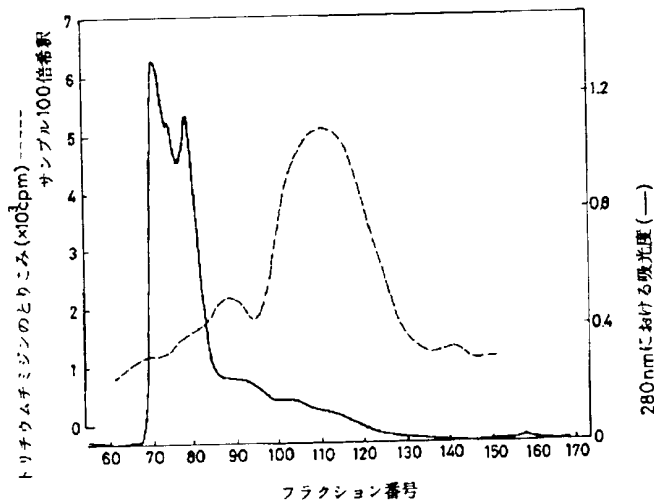
【図6】



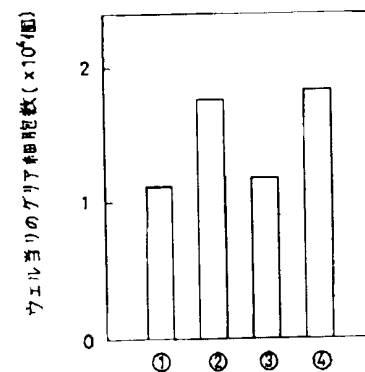
【図7】



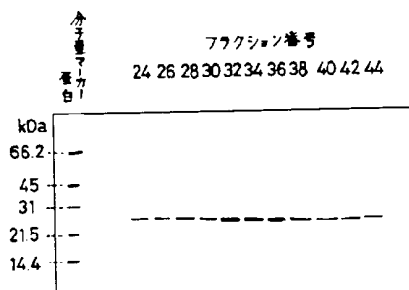
【図2】



【図9】

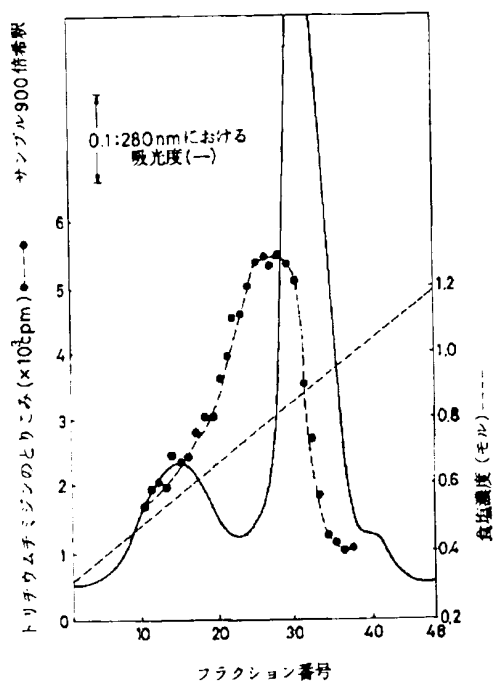


【図27】

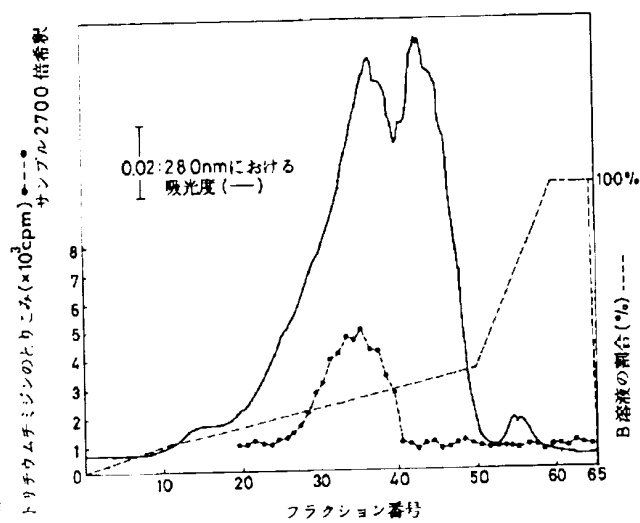


- ① 対照群  
 ② GAF 添加群  
 ③ ヘパリン添加群  
 ④ GAF およびヘパリン添加群

【図3】

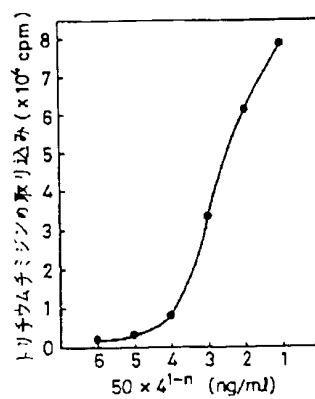
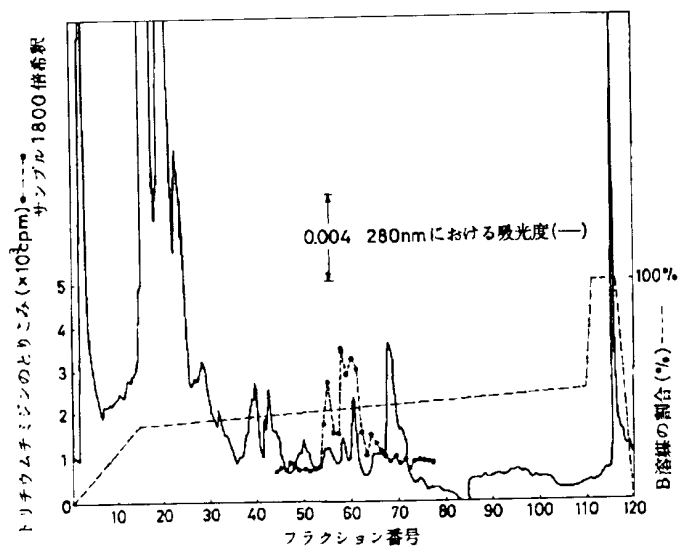


【図4】

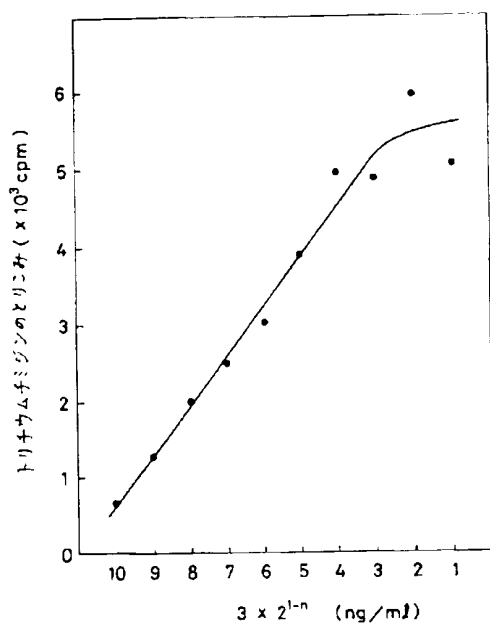


【図11】

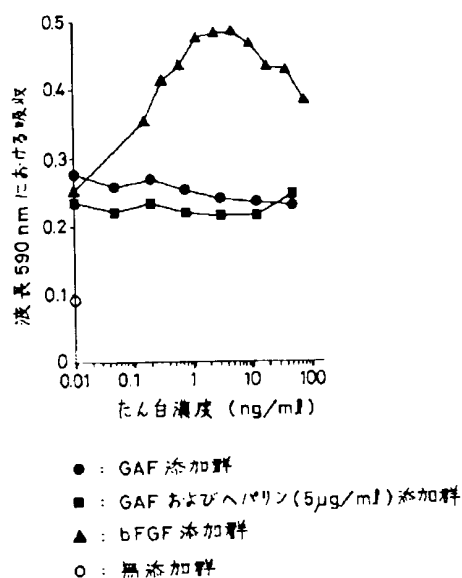
【図5】



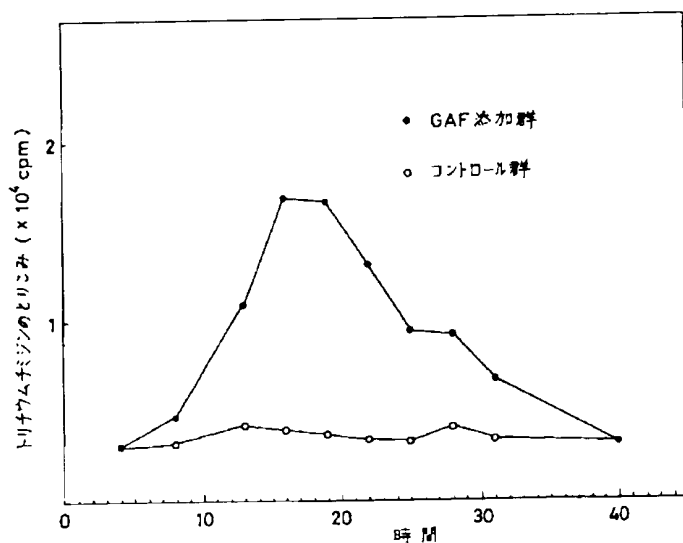
【図8】



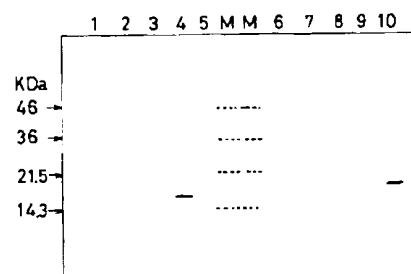
【図13】



【図10】

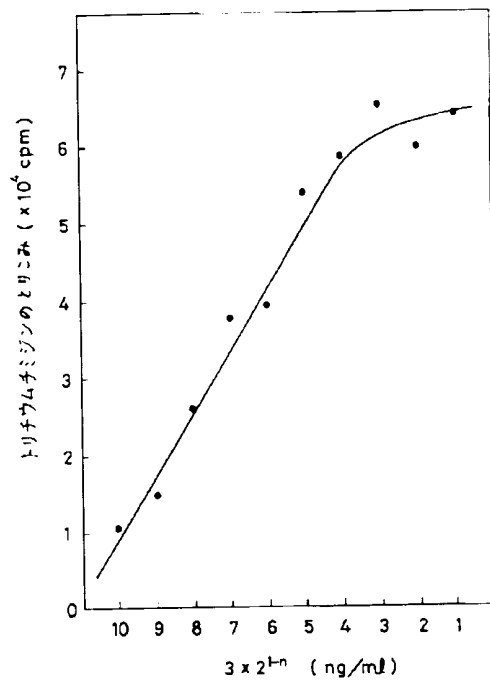


【図16】

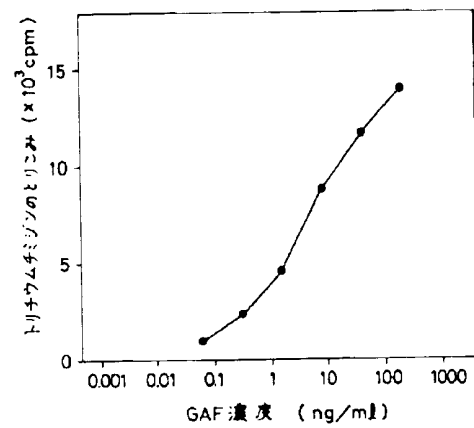


1,6:分子量 25,000GAF  
 2,7:分子量 29,000GAF  
 3,8:分子量 30,000GAF  
 4,9: acidicFGF  
 5,10: basicFGF  
 1~5: 抗acidicFGF ウサギポリクローナル抗血清  
 6~10: 抗basicFGF ウサギポリクローナル抗血清  
 M: 有色標準たん白質

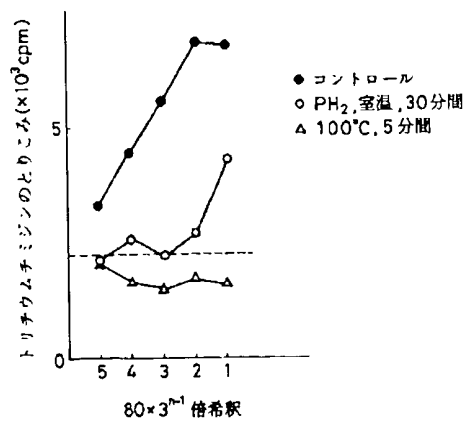
【図12】



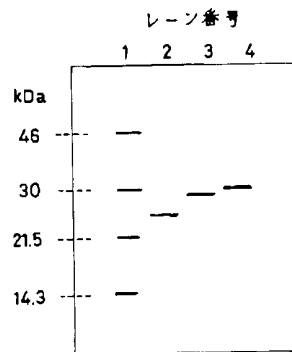
【図14】



【図15】



【図17】



1. 有色標準たんぱく (アマーシューム社製, 英国)
2. 25kDa GAF
3. 29kDa GAF
4. 30kDa GAF



【図19-1】

10 20 30 40 50 60  
TGAAACAGCAGATTACTTTTATTTATGCATTTAATGGATTGAAGAAAAAGAACCTTTTTTT

70 80 90 100 110 120  
TTCTCTCTCTCTCTGCAACTGCAGTAAGGGAGGGGAGTTGGATATACCTCGCCTAATATC

130 140 150 160 170 180  
TCCTGGGTTGACACCATCATTATTTGTTTATTCTTGTGCTCCAAAAGCGAGTCTCTGAT  
Me

190 200 210 220 230 240  
GGCTCCCTTAGGTGAAGTTGGGAACATTTTCGGTGTGCAGGATGCGGTACCGTTTGGGAA  
tAlaProLeuGlyGluValGlyAsnTyrPheGlyValGlnAspAlaValProPheGlyAs

250 260 270 280 290 300  
TGTGCCCGTGTGCCCGTGGACAGCCCGTTTTGTTAAGTGACCACCTGGGTGAGTCCGA  
nValProValLeuProValAspSerProValLeuLeuSerAspHisLeuGlyGlnSerGl

310 320 330 340 350 360  
AGCAGGGGGGCTCCCCAGGGGACCCGAGTCACGGACTTGGATCATTTAAAGGGGATTCT  
uAlaGlyGlyLeuProArgGlyProAlaValThrAspLeuAspHisLeuLysGlyIleLe

370 380 390 400 410 420  
CAGGCCGAGGCAGCTATACTGCAGGACTGGATTTCACTTAGAAATCTTCCCAATGGGTAC  
uArgArgArgGlnLeuTyrCysArgThrGlyPheHisLeuGluIlePheProAsnGlyTh

430 440 450 460 470 480  
TATCCAGGGAACCAGGAAAGACCACAGCCGATTTGGCATTCTGGAATTTATCAGTATAGC  
rIleGlnGlyThrArgLysAspHisSerArgPheGlyIleLeuGluPheIleSerIleAl

490 500 510 520 530 540  
ACTGGGCTGGTCAGCATTGAGGCGTGGACAGTGGACTCTACCTCGGGATGAATGAGAA  
aValGlyLeuValSerIleArgGlyValAspSerGlyLeuTyrLeuGlyMetAsnGluLy

550 560 570 580 590 600  
GGGGGAGCTGTATGGATCAGAAAACTAACCCAAGAGTGTATTTCAGAGAACAGTTTCCA  
sGlyGluLeuTyrGlySerGluLysLeuThrGlnGluCysValPheArgGluGlnPheGl

610 620 630 640 650 660  
AGAAAACCTGGTATAATACGTACTCGTCAAACCTATATAAGCACGTGGACACTGGAAGGCG  
uGluAsnTrpTyrAsnThrTyrSerSerAsnLeuTyrLysHisValAspThrGlyArgAr

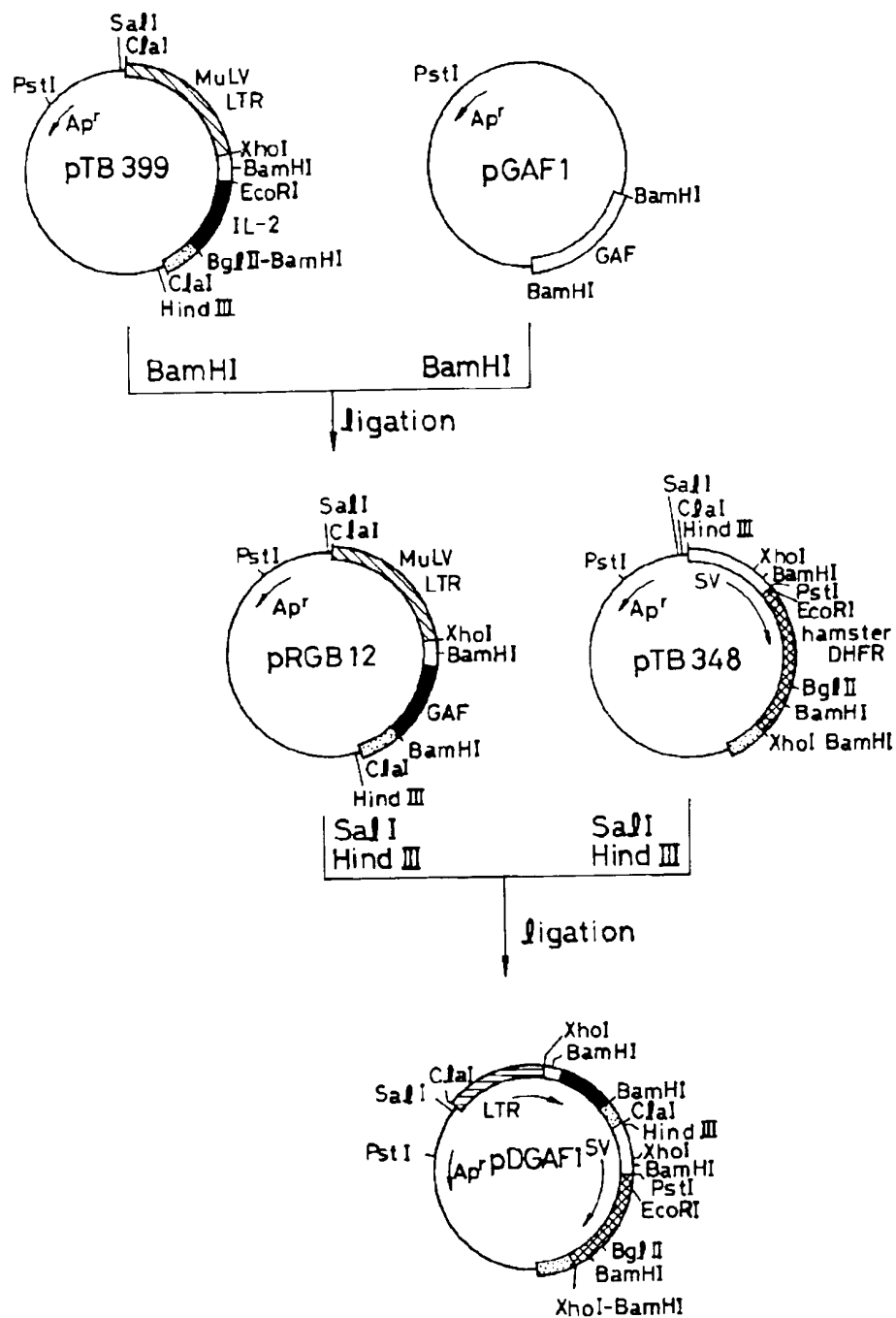
670 680 690 700 710 720  
ATACTATGTTGCATTAATAAAGATGGGACCCGAGAGAAGGGACTAGGACTAAACGGCA  
gTyrTyrValAlaLeuAsnLysAspGlyThrProArgGluGlyThrArgThrLysArgHis

730 740 750 760 770 780  
CCAGAAATTCACACATTTTTTACCTAGACCAGTGGACCCGACAAAAGTACCTGAACCTGTA  
sGlnLysPheThrHisPheLeuProArgProValAspProAspLysValProGluLeuTy

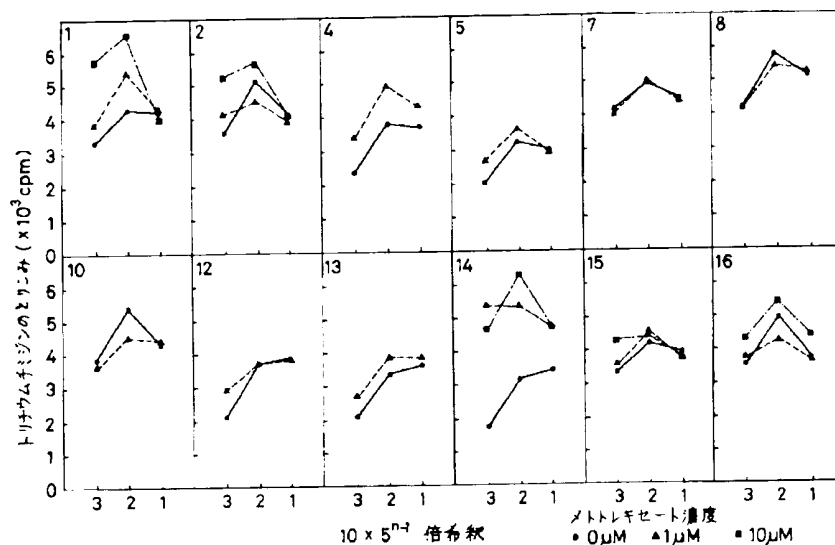
790 800 810 820 830 840  
TAAGGATATTCTAAGCCAAAGTTGACAAAGACAATTTCTTCACTTGAGCCCTTAAAAAAG  
rLysAspIleLeuSerGlnSerEnd

850 860 870 880 890 900  
TAACCACTATAAAGGTTTCACGCGGTGGTTCTTATTGATTGGCTGTGTCATCACATCAG

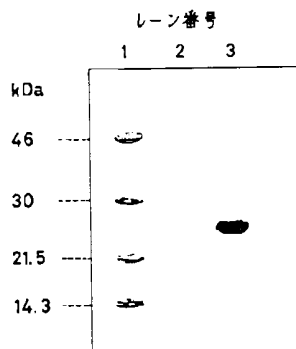
【図21】



【図22】

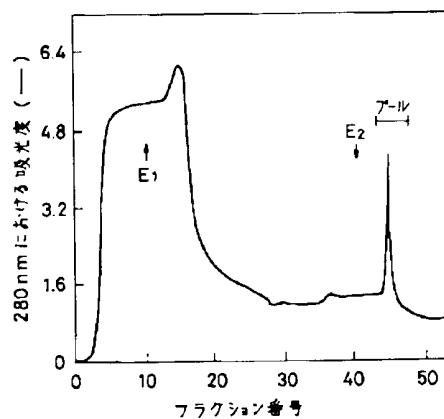


【図24】



1. 有色標準たんぱく (アマーシャム社製, 英国)
2. MM294 (DE3)/pLys, pET3-C抽出物
3. MM294 (DE3)/pLys, pETGAF1の抽出物

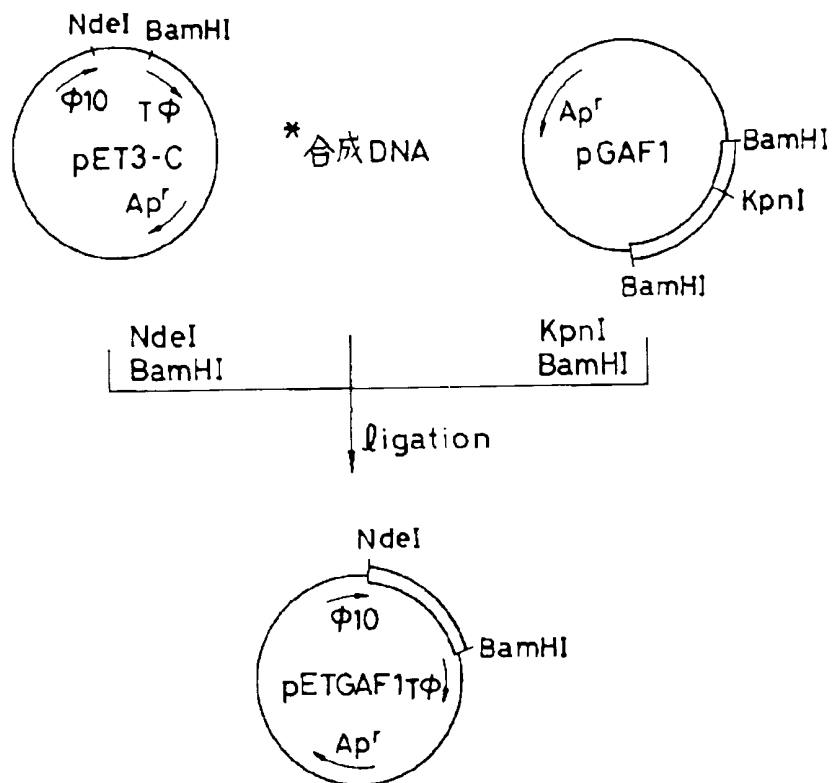
【図25】



- E1 : 12.5% 飽和硫酸と 2mM aPMSFを含む  
20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6)
- E2 : 15% グリセリン, 0.1% CHAPS および 2mM  
aPMSFを含む 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.6)



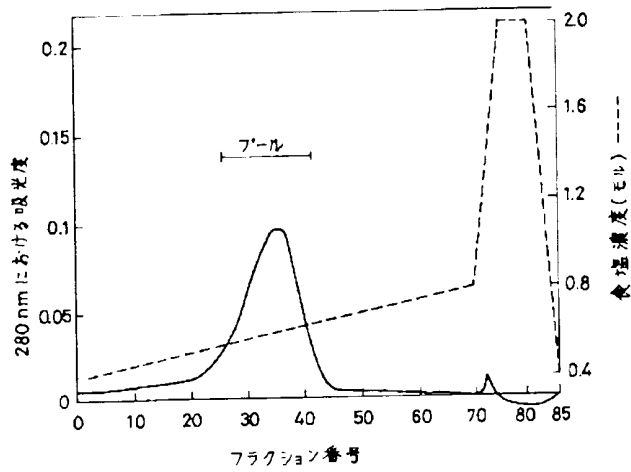
【図23】



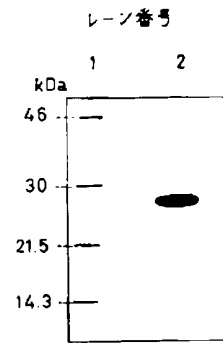
\*

5'-TATGTTAGGTGAAGTTGGGAAGTATTTCCGGTGTGCAGGATGCGGTAC-3'  
 ACAATCCACTTCAACCCTTGATAAAGCCACACGTCCTACGC

【図26】

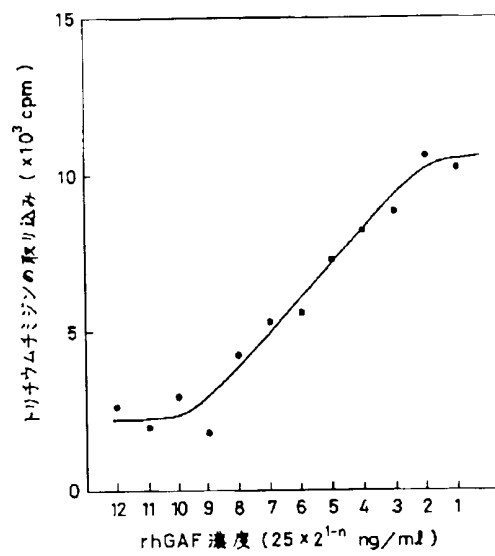


【図28】

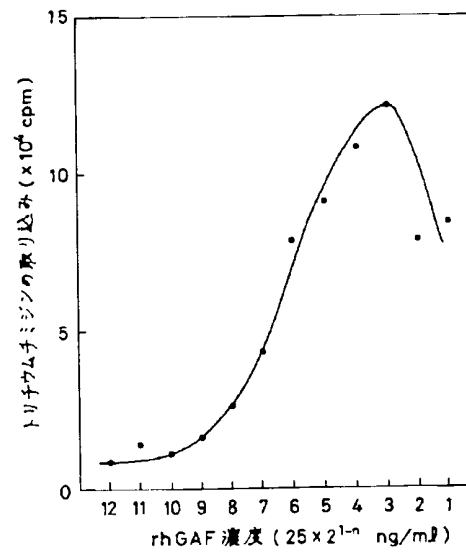


1. 有色標準たん白 (アマ-シム社製, 米国)  
2. 精製 rhGAF

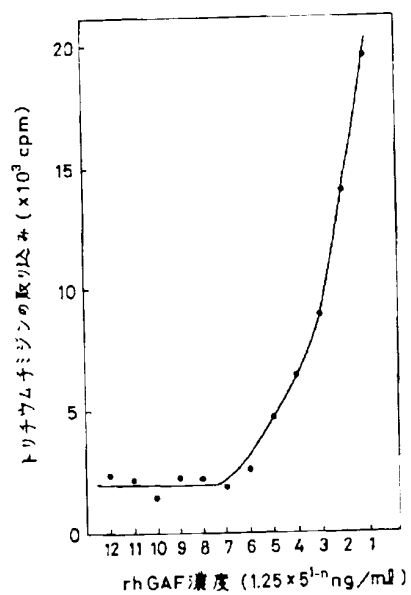
【図29】



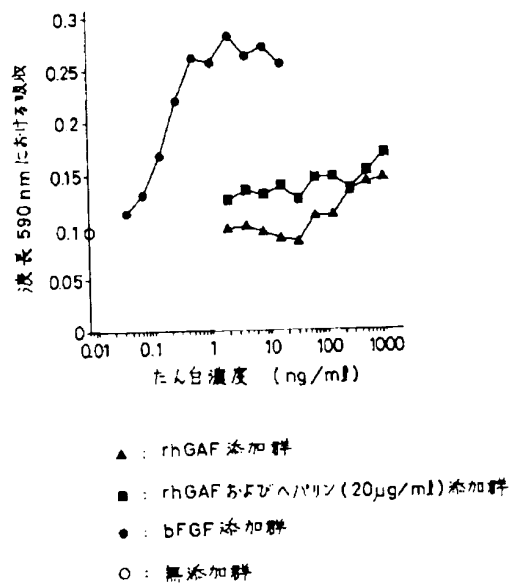
【図30】



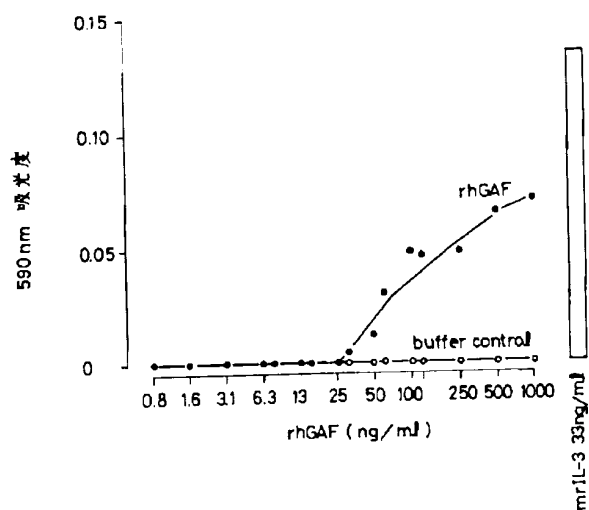
【図31】



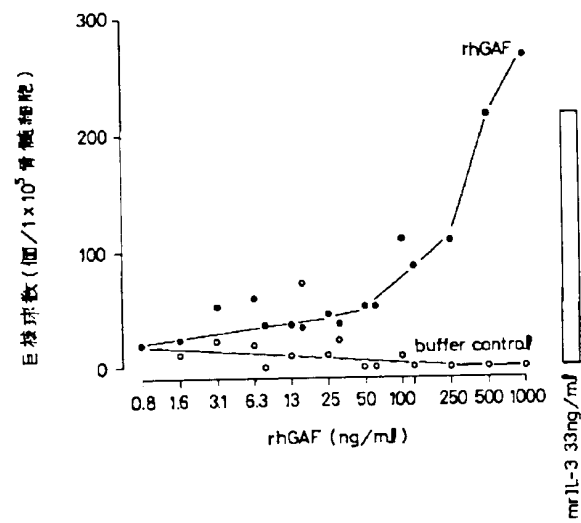
【図32】



【図33】



【図34】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.<sup>5</sup>

C 1 2 N 15/18

C 1 2 P 21/02

// A 6 1 K 37/02

(C 1 2 N 1/21

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:19)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:91)

識別記号

Z N A

庁内整理番号

H 8214-4B

A A B 8314-4C

A D S

F 1

技術表示箇所